

Université de Montréal

**Développement de méthodes de préparations d'échantillons pour
l'imagerie par spectrométrie de masse de tissus autres que
mammaliens**

Par

Elizabeth-Ann Kranjec

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Août 2016

©Elizabeth-Ann Kranjec, 2016

RÉSUMÉ:

L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) est une technique en pleine expansion ayant déjà été utilisée afin d'évaluer la distribution spatiale d'une grande variété de biomolécules. La plupart des applications découlent généralement du domaine médical et le modèle imagé est souvent mammalien, soit la souris ou le rat. L'optimisation de préparations d'échantillons sur ces modèles a permis d'obtenir de l'information reproductible et de grande qualité dans diverses applications biologiques. Il est cependant important de pouvoir reproduire les différentes préparations sur des échantillons diversifiés, permettant ainsi d'utiliser la technique dans plusieurs domaines de recherches différents. Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire décrivent l'optimisation de méthodes de préparations d'échantillons afin d'imager des protéines et des lipides à travers des sections tissulaires minces d'un échantillon animal non mammalien. L'échantillon à l'étude était le *Spodoptera exigua*, un lépidoptère, qui sous sa forme larvaire est bien connu une chenille ravageuse de plantation. L'optimisation d'une méthode permettant la découpe en section tissulaire mince de ce type d'échantillon sera d'abord présentée. Ensuite, l'optimisation d'une méthode de déposition de matrice par sublimation/recristallisation à des fins d'imagerie de protéines sera décrite. Les résultats obtenus ont permis d'obtenir des données de qualité quant à la distribution de différentes protéines à travers des sections de chenilles. De plus, l'optimisation d'une méthode de préparation d'échantillon par sublimation de la matrice sera décrite. Ainsi, l'évaluation de la distribution spatiale de quatre différentes classes de phospholipides à travers ces sections a été possible. Enfin, il est possible de conclure que la qualité des signaux obtenus pour l'imagerie des protéines et des lipides à partir de sections tissulaires minces de chenille est équivalente à celle normalement observée sur des tissus mammaliens.

Mots clés : Spectrométrie de masse, MALDI, chenille, protéines, lipides, imagerie

ABSTRACT:

Imaging mass spectrometry (IMS) is a technique in full expansion that has been used in a large range of studies to assess the spatial distribution of a wide range of biomolecules. Most of the applications ensuing from IMS studies correlate the molecular expression and the health status of a tissue in the medical biology field, using mammalian models such as mice or rats. Optimization of different sample preparation methods for these models has permitted high quality and reproducible information in numerous biological applications. However, it is important to be able to reproduce this level of sample preparation and the quality of resultant data on a wider range of samples. This will open the technology to several scientific fields. The research work presented in this thesis proposes sample preparation methods to image the distribution of proteins and lipids across a thin tissue section of a non-mammalian model. This model is a moth, the *Spodoptera exigua*, one of the best-know agricultural pest insects in it's caterpillar form. Firstly, optimization of sample handling prior to cutting thin tissue sections will be presented. Then, optimization of a matrix deposition method using sublimation/recrystallization in order to image the proteins across the sample will be described. Also, a sublimation method for the detection and imaging of lipids is described. The imaging results showed the distribution of four different classes of phospholipids across thin sections of the caterpillar. Lastly, the quality of imaging data for proteins and phospholipids across caterpillar sections can be compared directly to the expected data quality obtained from mammalian tissue sections.

Keywords: Mass spectrometry, MALDI, caterpillars, proteins, lipids, imaging

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	x
INTRODUCTION	1
1.1 L’histoire de la spectrométrie de masse	1
1.2 Théorie de la spectrométrie de masse	2
1.3 La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	8
1.3.2. La désorption	9
1.3.3 L’ionisation	10
1.3.4 Matrices MALDI.....	12
1.3.5 Laser et flux d’énergie en MALDI	14
1.4 L’analyseur par temps de vol	15
1.5 Spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF	24
1.6 L’imagerie par spectrométrie de masse	25
1.7 Préparation des échantillons pour l’imagerie MS par MALDI.....	27
1.7.1 Préservation des échantillons tissulaires par congélation.....	27
1.7.2 Découpe des échantillons en sections minces.....	29
1.7.3 Lavage des sections.....	30
1.7.4 Choix et mode de déposition de la matrice	31
1.7.5 Acquisition des données	34
1.8 Objectif de recherche.....	35
PARTIE EXPÉRIMENTALE	38
2.1 Préparation d’un homogénat de foies de souris	38
2.2 Préparation des chenilles.....	38
2.3 Préparation des diverses sections destinées à l’imagerie de protéines	39
2.3.1 Lavage des sections.....	39
2.3.2. Déposition de matrice et recristallisation pour l’imagerie MS des protéines	40
2.4 Préparation des sections destinées à l’imagerie MS des lipides	42

2.5 Spectrométrie de masse par MALDI	42
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	44
3.1 Encastrement dans l'OCT et découpe en section minces de la chenille.....	44
3.2 Sublimation/recristallisation de SA pour l'imagerie MS de protéines dans une section de chenille.....	45
3.2.1 Optimisation des lavages	46
3.2.2. Optimisation du solvant de recristallisation	51
3.2.3 Optimisation du temps de recristallisation.....	54
3.2.4. Imagerie de protéines d'une section de chenille du 4 ^{ième} stade larvaire.....	56
3.3 L'imagerie MS de lipides dans une section de chenille.....	57
CONCLUSION.....	61
3.1 Perspectives de recherche	62
BIBLIOGRAPHIE:	63
ANNEXE 1 :	71
ANNEXE 2	72

LISTE DES FIGURES :

Figure 1. Composantes d'un spectromètre de masse.....	4
Figure 2. Spectre de masse obtenu par impact électronique de 70 eV de l'acétophénone.....	5
Figure 3. Patron isotopique d'une molécule à différents nombres de carbones.....	6
Figure 4. Patron isotopique de l'ion $[M+H]^+$ de l'insuline bovine calculé à différentes résolutions en masse.....	7
Figure 5. a) Schéma de la géométrie du panache d'expansion en fonction de la position du laser. b) Image CCD présentant le panache d'expansion suivant la désorption de la matrice et de protéines colorées en fonction du temps.....	10
Figure 6. Schéma d'un tube de temps de vol linéaire.....	16
Figure 7. Schéma d'un spectromètre de masse par de temps de vol avec un réflectron.....	19
Figure 8. a) Dispersion des ions suite à l'impulsion laser durant le délai avant l'extraction. b) Gradient de voltage appliqué entre les deux grilles permettant aux ions près de la source d'être accélérés davantage. c) Les ions de plus faibles vitesses rejoignent les plus rapides pour tous arriver au détecteur en même temps.....	21
Figure 9. Comparaison de spectres MALDI-TOF MS obtenus pour l'angiotensine I (m/z 1296.68) quand l'acquisition est faite en utilisant un champ d'extraction constant (static) et un réflectron (reflector), en utilisant l'extraction retardée (delayed) en TOF linéaire (linear), puis finalement en combinant l'extraction retardée et un réflectron. Le parcours des ions à travers le tube de temps de vol en mode linéaire est de 1,3 mètres et 2,0 mètres en mode réflectron. b) Comparaison des mêmes paramètres d'acquisitions, mais avec un parcours des ions à travers le tube de temps de vol en mode linéaire est de 2,0 mètres et 3,0 mètres en mode réflectron.....	23
Figure 10. Schéma d'un spectromètre de masse MALDI LIFT-TOF/TOF.....	25
Figure 11. Étapes nécessaires pour la réalisation d'une expérience d'imagerie MS par MALDI...	27

Figure 12. Système de sublimation assemblé au laboratoire.....	33
Figure 13. Préparation d'une chenille en vue de sa découpe en sections tissulaires minces à l'aide d'un cryostat.....	39
Figure 14. Montage utilisé comme chambre de recristallisation.....	41
Figure 15. Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles de foie homogène (12µm) suite à différents protocoles de lavages suivant une déposition manuelle d'une solution de matrice de 15mg/mL (ACN, H ₂ O; v/v).....	47
Figure 16.a-b) Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils protéiques de sections sérielles de chenille (12µm) et de foie de souris (12µm) suite à un lavage au formate d'ammonium (mauve, haut) et au Carnoy's (rouge, bas) en amont d'une sublimation/recristallisation de la matrice (SA).c-d) Comparaison du nombre de polypeptides observés suivant ces paramètres pour la préparation des échantillons (n=3).....	49
Figure 17. Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles d'homogénat de foie (12 µm) après une recristallisation de 3 min de la matrice avec différentes solutions.....	52
Figure 18. Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles de chenille (12 µm) après une recristallisation de 3 min de la matrice avec différentes solutions.....	53
Figure 19. Nombre de protéines détectées en fonction du temps de recristallisation pour des sections d'homogénat de foie (bleu, haut) et de chenille (jaune, bas).....	55
Figure 20. MALDI IMS une section tissulaire mince de chenille de 12µm après sublimation/recristallisation de la matrice (SA) et acquisition avec une résolution spatiale de 50µm. Les images présentent la distribution de signaux de protéines sur toute la longueur de chenille en corrélation avec l'histologie (H&E).....	57
Figure 21.. Comparaison des signaux lipidiques obtenus, entre m/z 500 et 1000, sur une section de chenille suivant la sublimation de trois matrices, soit le DAN, le 2-MBT et le DHB. Les spectres	

en bleu (haut) et ceux en rouge (bas) représentent respectivement les modes d'ionisation positif et négatif.58

Figure 22. MALDI IMS une section tissulaire mince de chenille de 12µm après sublimation de la matrice (DAN) et acquisition avec une résolution spatiale de 50µm. Les images présentent la distribution de signaux de lipides sur toute la longueur de chenille en corrélation avec l'histologie (H&E). Les signaux en rouges représentent des espèces observées en ionisation négative, tandis que les signaux en bleus représentent d'autres espèces observées en ionisation positive. * indique un adduit potassium.....60

Figure supplémentaire S-1. Spectres MALDI MS/MS typiques des phospholipides observés dans une section tissulaire de chenille : A) PA(35:1) B) PE(36:4) C) PC(34:1) D) PI(44:0). Un schéma de fragmentation est présenté pour chaque espèce. Les MS/MS des PC ont été acquis en ionisation positive, tandis que ceux pour les PA, PE et PI ont été acquis en ionisation négative.....73

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I. Principaux composés utilisés comme matrice en MALDI MS et leurs possibilités d'analyse.....	13
---	----

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS :

Note : Pour simplifier la consultation des références, les abréviations en anglais sont utilisées dans ce mémoire. La description en français est donnée, puis celle en anglais est inscrite en italique

CHCA : Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique, *Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid*

DAN : 1,5-diaminonaphtalène, *1,5-diaminonaphtalene*

DESI : Désorption/ionisation par électronébulisation, *Desorption electrospray ionization*

DHB : Acide 2,5-dihydroxyboïque, *2,5-dihydroxybenzoic acid*

ESI : Ionisation par électronébulisation, *Electrospray ionization*

FAB : Bombardement d'atomes rapides, *Fast atom bombardment*

ITO : Indium-étain oxydé, *Indium-tin oxide*

IMS : Imagerie par spectrométrie de masse, *Imaging mass spectrometry*

MALDI : Désorption/ionisation laser assistée par matrice, *Matrix assisted laser desorption/ionization*

MS : Spectrométrie de masse, *Mass spectrometry*

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

MM : Masse moléculaire, *Molecular weight*

m/z : Ratio masse sur charge

OCT : *Optimal cutting temperature*

PA : Acide phosphatidique, *Phosphatidic acid*

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PI : Phosphatidylinositol

PS : Phosphatidylsérine

SA : Acide sinapinique, *Sinapinic acid*

SIMS : Spectrométrie de masse d'ions secondaires, *Secondary ion mass spectrometry*

S/N : Signal sur bruit

TOF : Temps de vol, *Time-of-flight*

REMERCIEMENTS :

Je tiens d'abord à remercier mes parents, Line Chartrand et Drago Kranjec, qui m'ont toujours soutenu dans mes projets en m'apportant leur soutien et leurs conseils. De plus, j'aimerais remercier ma copine, Dominique Bergeron, qui a réussi à m'encourager et me supporter dans les jours les plus difficiles. Je voudrais également remercier tous mes amis et collègues avec qui j'ai eu tant de plaisir et de discussions pendant mes études graduées. Une mention spéciale à Audrey Gosselin-Janelle, Jérémie Labrecque-Carbonneau et Jean-Christophe Grenier-Petal, ces amis formidables avec lesquels j'ai pu me découvrir une passion dans l'implication universitaire et dans la gestion en tant que responsable du Café-In.

Je tiens également à remercier tous les membres du groupe de recherche, soit Martin, Ethan, Heath et Nidia, sans oublier notre ancien collègue Érik, qui m'ont apporté leurs précieux conseils tout au long de mes études.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Pierre Chaurand, qui m'a encadré, conseillé et épaulé tout au long de ma formation. Sa disponibilité et ses grandes qualités humaines m'ont aidé dans les moments plus difficiles. Il m'a donné l'opportunité de faire partie de son groupe et il a toujours cru en moi. Je lui présente tout mon respect et ma gratitude.

INTRODUCTION :

Les travaux exposés dans ce mémoire portent sur le développement et l'optimisation de méthodes de préparation d'échantillons, appliquées à un modèle non mammalien, en vue de leur analyse par imagerie par spectrométrie de masse (IMS). Ce mémoire se divise en quatre sections distinctes. Le premier chapitre décrira les principes liés à la spectrométrie de masse, et plus particulièrement de l'imagerie MS, afin de montrer la pertinence de développer une telle approche expérimentale dans le domaine de la biologie animale. Le second chapitre portera sur la partie expérimentale liée à la méthodologie développée pour l'imagerie MS du modèle à l'étude. Le troisième chapitre portera sur les différents résultats obtenus et le dernier chapitre sera la conclusion et les perspectives de recherches liées à ce domaine.

1.1 L'histoire de la spectrométrie de masse

C'est Joseph John Thompson, un physicien, qui est aujourd'hui considéré comme l'un des premiers pionniers de la spectrométrie de masse.¹ En effet, en 1897, il travaille avec un tube à décharge électrique et ses résultats l'amènent à la découverte de l'existence de l'électron. Il trouve que la masse d'une petite particule chargée négativement correspond à 1/1800 de celle de l'hydrogène, l'atome ayant la plus petite masse. Il venait donc de déterminer le ratio masse sur charge de l'électron (m/e).² Thompson modifie par la suite son instrument, ce qui lui permet de défléchir un rayon de particules positives via l'utilisation de champs électriques et magnétiques. Ces ions traversaient ensuite un espace libre de champs pour être détectés sur une plaque photographique. L'hypothèse de Thompson était que les particules chargées les plus légères étaient plus défléchies que les plus lourdes, fondant ainsi le principe général de la spectrométrie de masse.² Avec cet instrument, Thomson a été en mesure d'identifier les ions H^+ , H_2^+ , He^+ ainsi que les isotopes $^{22}Ne^+$ et $^{20}Ne^+$. C'était la première preuve formelle de l'existence des isotopes des éléments. Francis William Aston, un des étudiants de Thompson, a poursuivi ses travaux sur les isotopes. Aston a construit trois instruments, chacun comportant plusieurs améliorations.³ Plus de 50 éléments non radioactifs, ainsi que l'abondance naturelle de leurs

isotopes, ont pu être analysés avec ces instruments. En 1919, un autre physicien, Arthur Jeffrey Dempster, construit le premier spectromètre de masse à secteur magnétique possédant une précision en masse cent fois supérieure aux précédents.² Les fondements théoriques et la géométrie de cet instrument sont encore à la base des instruments d'aujourd'hui.

Avec le développement des techniques d'ionisation telles que l'impact électronique, et l'ionisation chimique, les petites molécules organiques peuvent maintenant être analysées par spectrométrie de masse. Dans les années 1950, la commercialisation des spectromètres de masse amène ceux-ci à sortir des laboratoires spécialisés, et deviennent ainsi un outil analytique très important dans un nombre grandissant de domaines.² Cependant, ses applications dans le domaine de la biochimie étaient très restreintes puisque les méthodes d'ionisation permettant l'analyse de biomolécules étaient limitées. En effet, dans les années 60, deux méthodes permettaient l'ionisation de relativement petites biomolécules apparaissent, soit la désorption par plasma⁴ et l'ionisation par bombardement rapide d'atomes (FAB)⁵. Le développement de deux nouvelles méthodes d'ionisation dans les années 1980, soit la nébulisation ionisation électrostatique (electrospray ionization, ESI)⁶ et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)⁷⁻⁸ permettent maintenant l'analyse de protéines de haut poids moléculaire. Il aurait probablement été difficilement imaginable d'observer une expansion aussi fulgurante du domaine de la protéomique sans le développement de ces deux méthodes.

1.2 Théorie de la spectrométrie de masse

Le principe de base de la spectrométrie de masse s'appuie sur la formation d'ions de composés organiques ou inorganiques, et ce par diverses méthodes. Ces ions sont ensuite séparés via leur rapport masse sur charge (m/z), puis détectés de façon qualitative et quantitative en fonction de leurs abondances respectives.⁹ À partir d'une seule analyse, un spectre de masse est généré. C'est un graphique qui présente le courant d'ions mesuré en fonction du rapport de masse (dalton) sur sa charge élémentaire (m/z en Thomson ou Th).¹⁰ Cependant, les unités de ce

ratio sont généralement omises. L'intensité du signal reflète l'abondance de l'ion de m/z spécifique, créé dans la source d'ionisation et qui correspond à l'analyte présent dans l'échantillon.

L'un des principaux avantages de la spectrométrie de masse comme technique analytique est le fait de pouvoir, en général, déduire la structure de la molécule étudiée, et donc, d'apporter une identification formelle. Elle permet également d'apporter des informations quantitatives sur les analytes, et ce avec une bonne sensibilité ainsi qu'une spécificité non-égalée. De plus, la spectrométrie de masse permet l'étude de la dynamique de réaction et la chimie des ions, afin d'obtenir des informations sur certaines propriétés physiques, telles que l'énergie d'ionisation, l'énergie apparente, l'enthalpie de réactions et l'affinité entre les protons et les ions. Elle est donc une des techniques analytiques des plus sensibles et versatiles utilisées dans les plusieurs domaines, dont ceux de la chimie et de la biochimie.¹¹

Tout type de spectromètre de masse contient quatre composantes communes, soit une section dédiée à l'introduction de l'échantillon, une source de productions d'ions, un analyseur en masses et un détecteur. De plus, de nos jours, tout instrument est équipé d'un système informatique qui permet le contrôle de toutes les fonctions de l'instrument, en plus de recueillir et d'effectuer le traitement primaire des données.

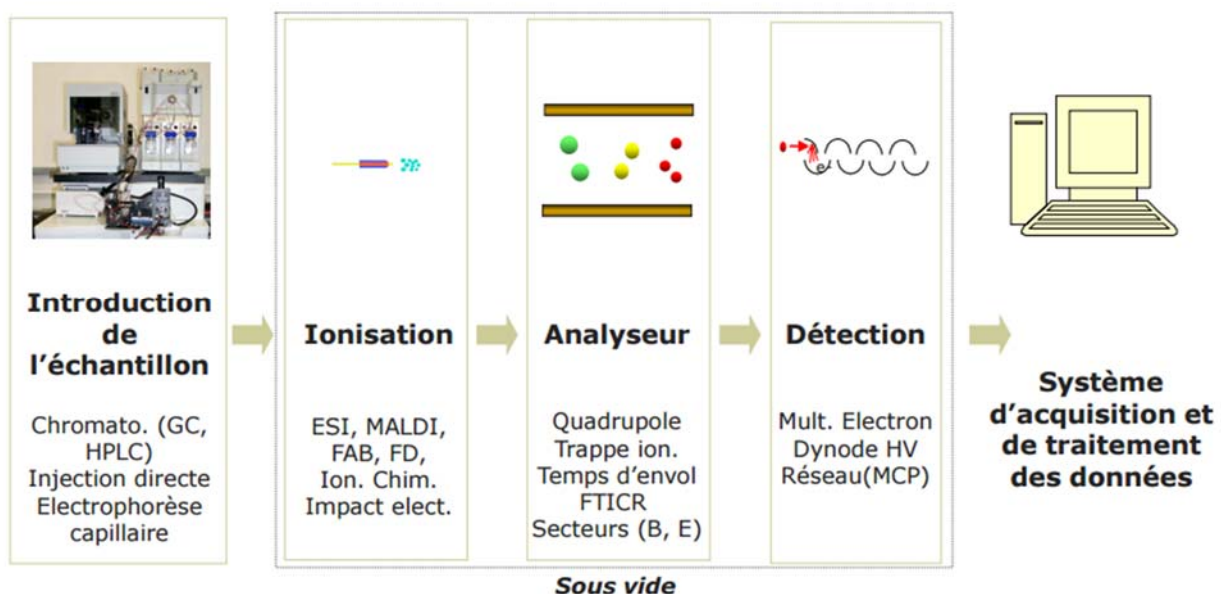


Figure 1. Composantes d'un spectromètre de masse.¹² (Notes de cours CHM2102 - reproduction autorisée par Pierre Thibault)

L'ionisation de l'analyte est la première étape critique pour une analyse par spectrométrie de masse. En effet, la clé du succès pour ce type d'analyse réside dans la conversion d'un composé neutre vers une espèce ionique en phase gazeuse. Plusieurs techniques d'ionisation ont été utilisées au fil des années, cependant, aucune d'elle n'est considérée comme universelle. En effet, le choix du mode d'ionisation utilisé dépend grandement du type d'analyte à l'étude, ainsi que du type d'information désiré.¹¹ La façon la plus facile de produire un ion en spectrométrie de masse passe par l'ionisation via un bombardement des molécules en phase gazeuse de l'échantillon avec un faisceau d'électrons. C'est la forme d'ionisation qui est communément appelée impact électronique. Lors de ce processus, un électron est éjecté de l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie de l'analyte (HOMO), formant ainsi un ion moléculaire chargé positivement :¹¹



Pour l'analyse d'un seul composé, le pic correspondant au m/z le plus élevé représente généralement la molécule intacte ionisée, appelée ion moléculaire. Le pic de l'ion moléculaire est généralement accompagné par plusieurs pics de plus faible m/z , représentant les ions fragments.⁹ Le pic le plus intense du spectre (pour une analyse d'une seule molécule), est appelé pic de base et son intensité est normalisée à 100%. L'intensité des autres pics s'expriment en pourcentage de celle du pic de base.¹⁰

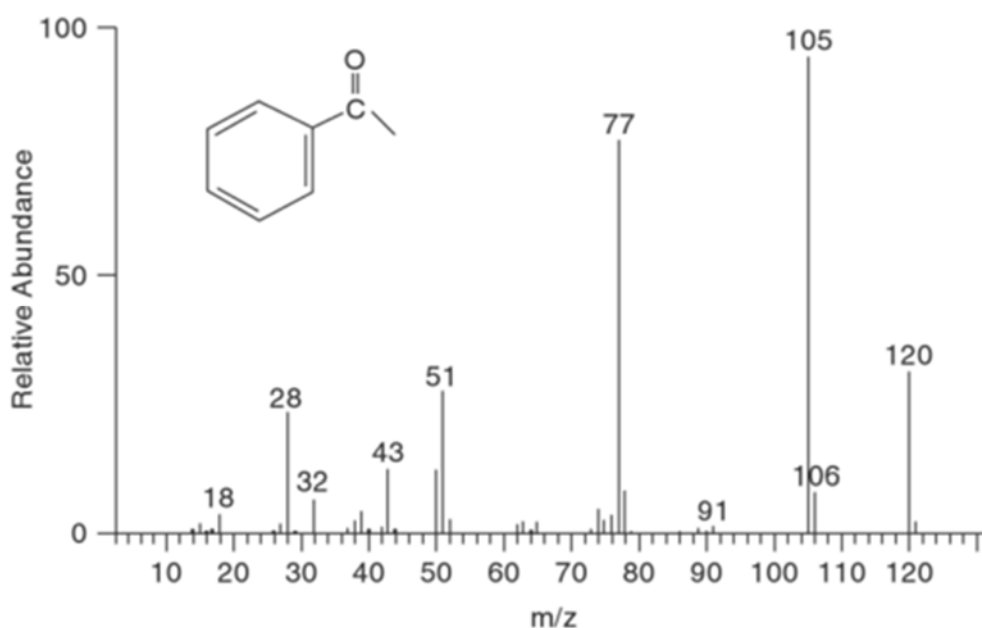


Figure 2. Spectre de masse obtenu par impact électronique de 70 eV de l'acétophénone (MM = 120 u)¹¹

Dans ce type de spectre de masse, on observe la masse exacte d'un ion positif formé par l'abstraction d'un électron, ce qui correspond à la masse mono-isotopique de cette molécule moins la masse d'un électron. La masse mono-isotopique d'une molécule correspond à la somme des masses exactes de chacun des isotopes les plus abondants des différents éléments composant cette molécule. Chaque molécule présentera dans le spectre un ratio isotopique. Les molécules à l'étude ne présentent pas une composition d'éléments mono-isotopiques

seulement. En effet, il y a une abondance naturelle de différents isotopes stables de certains éléments, ce qui amène une distribution isotopique de l'ion enregistré sur un spectre. Par exemple, pour l'atome de carbone, l'isotope le plus abondant est le ^{12}C , présentant une abondance naturelle 98,90%, tandis que l'autre isotope stable du carbone, soit le ^{13}C , présente une abondance naturelle non négligeable de 1,10%. Dans un spectre de masse, si la molécule à l'étude est formée 5 carbones, elle aura un patron isotopique composé de trois pics, chacun séparé par un m/z de 1,003, avec des intensités relatives à l'abondance naturelle du ^{13}C dans celle-ci. Le premier pic correspond à celui de base, tel que défini plus haut, l'intensité du second présente la probabilité d'avoir un ^{13}C pour cette molécule, et l'intensité du dernier présente la probabilité d'avoir deux ^{13}C dans la molécule. À un nombre élevé de carbones, le pic représentant la masse mono-isotopique de l'ion n'est pas nécessairement le plus intense, puisque la probabilité d'avoir au moins une molécule de ^{13}C dans la molécule devient plus importante.

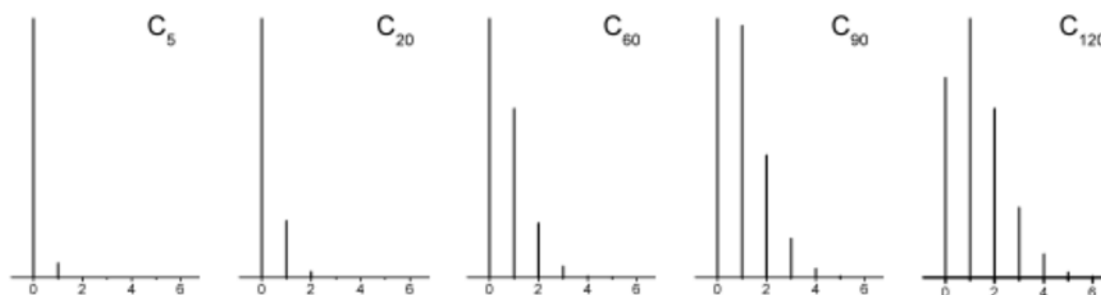


Figure 3. Patron isotopique d'une molécule à différents nombres de carbones.⁹

La précision en masse dans ce type d'analyse correspond à l'erreur, généralement donnée en partie par millions (ppm), entre la masse (mono-isotopique) expérimentale donnée par le spectre et la masse (mono-isotopique) théorique de l'ion moléculaire. Une bonne précision en masse est généralement obtenue lorsque les pics du spectre sont fins et bien séparés les uns des autres. On définit le terme résolution comme étant la capacité d'un spectromètre de masse à pouvoir distinguer deux signaux voisins. Plus la résolution est élevée, plus la différence de masse entre deux signaux distincts peut être faible. En spectrométrie de masses, la résolution R est définie

par le ratio de la masse d'intérêt, m , sur la différence de masse Δm , qui correspond à la largeur à mi-hauteur d'un pic.¹³

$$R = m/\Delta m \quad [1]$$

Deux signaux distincts sont considérés comme résolus, si la jonction entre les deux pics se fait à une hauteur correspondant à 10% ou moins de leur intensité maximale. Il est désirable d'obtenir une résolution spectrale permettant d'observer le patron isotopique de l'espèce à l'étude. Par exemple, pour résoudre entièrement le patron isotopique de l'insuline bovine (MM = 5735 Da), il est nécessaire d'avoir une résolution atteignant les 10 000.

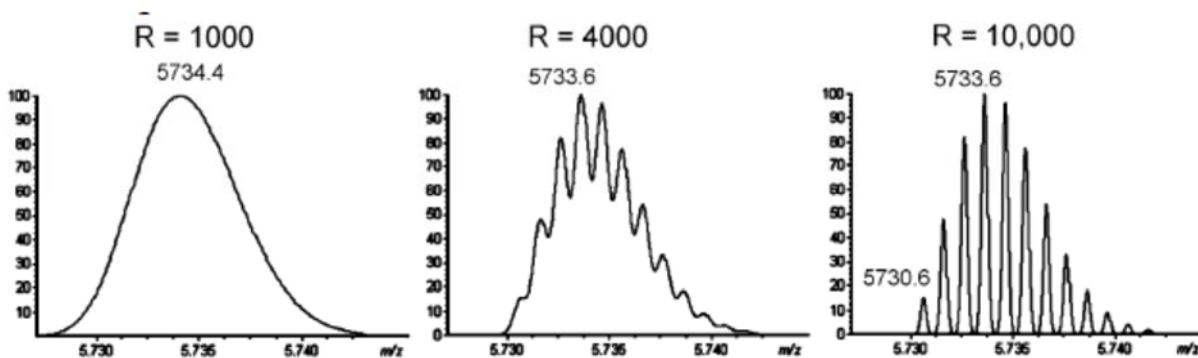


Figure 4. Patron isotopique de l'ion $[M+H]^+$ de l'insuline bovine calculé à différentes résolutions en masse.⁹

À résolution 1000, il est possible d'observer l'enveloppe isotopique de la molécule et de déterminer la masse moyenne de l'ion moléculaire au barycentre du pic. Comparativement à la masse mono-isotopique, la masse moyenne tient compte de l'abondance isotopique. La résolution permet d'obtenir des mesures précises, mais pas nécessairement exactes. L'exactitude dépend plutôt de la qualité de l'étalonnage préalable de l'appareil. Il peut être important d'avoir une haute résolution des signaux pour une étude précise, mais il se peut

également que pour un autre type d'étude, la résolution n'ait pas besoin d'être aussi importante. C'est une note à considérer, puisque ce n'est pas tous les types d'analyseurs de masse qui permettent d'obtenir des hautes résolutions.

1.3 La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Dans certaines techniques, l'ionisation est effectuée par la capture ou l'éjection d'un électron, ce qui forme respectivement un cation radicalaire $[M^{+\bullet}]$ ou un anion radicalaire $[M^{\bullet-}]$. Dans d'autres techniques, l'ionisation peut s'effectuer via l'addition ou l'abstraction de proton, ce qui forme respectivement un cation $[M+H]^+$ ou un anion $[M-H]^-$. Enfin, il est également possible que l'ionisation s'accomplisse par l'adduit de cations métalliques tels que Na^+ et K^+ , ainsi que par l'adduit d'anions tels que Cl^- . Dans le domaine de la biochimie appliquée, il y a deux techniques d'ionisation grandement utilisés en spectrométrie de masse, soit l'électrospray (ESI) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

1.3.1 Historique du MALDI

La désorption laser à des fins d'utilisation en spectrométrie de masse existe déjà depuis le milieu des années 1960.¹⁴ Cependant, même si l'analyse de sels organiques de faible poids moléculaire et certaines molécules organiques aromatiques étaient facilement accessibles par désorption laser, l'analyse des biomolécules étaient beaucoup plus difficiles, surtout si leur poids moléculaire excédait les 2000 Daltons.¹⁵ Deux approches développées indépendamment ont mené à l'introduction de la source de désorption et d'ionisation laser assistée par matrice en 1988. D'abord, deux chercheurs allemands, Mickael Karas et Franz Hillenkamp présentent le renforcement du rendement de production d'ions provenant de molécules n'absorbant pas à la longueur d'onde du laser, et ce via le mélange de celles-ci avec une molécule absorbante.¹⁶ Ils ont ainsi été capable d'ioniser l'acide aminé alanine qui n'absorbe pas l'irradiation à 266nm, et ce à l'aide d'une autre molécule, l'acide aminé tryptophane qui elle absorbe à cette longueur d'onde.¹⁷ Pendant ce temps, l'ingénieur japonais Koichi Tanaka, de la corporation Shimadzu, a

mélangé des particules de cobalt (30nm) dans une solution de glycérol contenant l'analyte d'intérêt pour permettre sa désorption de manière intacte et son ionisation. Avec cette méthode, il a été en mesure d'ioniser des protéines jusqu'à la carboxypeptidase-A, ayant un poids moléculaire de 34kDa.⁷ Officiellement, c'est Tanaka qui a décrit l'ionisation de protéines via la technique MALDI en premier. Il a reçu le prix Nobel de chimie en 2002 pour ses travaux. Cependant, quelques mois après Tanaka, Karas et Hillenkamp ont également décrit l'ionisation de protéines, soit l'albumine (67kDa), en utilisant l'acide nicotinique comme matrice.⁸ Leur méthode d'ionisation via l'ajout d'une molécule organique comme matrice est devenue la plus populaire et reste encore de nos jours de loin la plus utilisée.

L'ionisation par MALDI est une méthode considérée comme douce et permet l'analyse par MS de molécules de hauts poids moléculaires, se qualifiant donc comme une méthode incontournable dans le domaine de la chimie bioanalytique. Les spectres obtenus par un instrument utilisant une source MALDI présentent principalement des espèces moléculaires mono-chargées. Il est possible d'observer quelques ions multichargés et une certaine fragmentation, mais somme toute, les spectres MALDI MS sont relativement simples et permettent l'analyse de mélanges complexes.

1.3.2. La désorption

La première étape de la désorption en MALDI constitue à mélanger l'échantillon contenant l'analyte d'intérêt à une solution de petites molécules organiques, dites les matrices, ayant de forts coefficients d'extinction ϵ à la longueur d'onde du laser utilisé. Le mélange, dans un rapport moléculaire de l'ordre de 1 pour 5000, est déposé sur la cible MALDI et suite à l'évaporation des solvants, il y a formation de co-cristaux de matrice et d'analyte. Une fois le dépôt matrice/analyte sec sur la cible, cette dernière est introduite dans la source sous vide du spectromètre de masse. Il y a ensuite irradiation des co-cristaux par des impulsions laser intenses et très brèves (de l'ordre de quelques nanosecondes). Pour chaque impulsion, l'énergie photonique émise par le laser est absorbée par la matrice, et, s'ensuit l'accumulation d'une grande quantité de chaleur dans les

co-cristaux via l'excitation des molécules de matrice. Cette énergie thermique accumulée localement est suffisante pour sublimer les cristaux de matrice entraînant les molécules d'analytes, co-cristallisés. Il y a donc ablation de la surface irradiée, créant ainsi un panache d'expansion contenant les molécules de matrice et l'analyte intactes en phase gazeuse dans le vide de la source.¹⁸

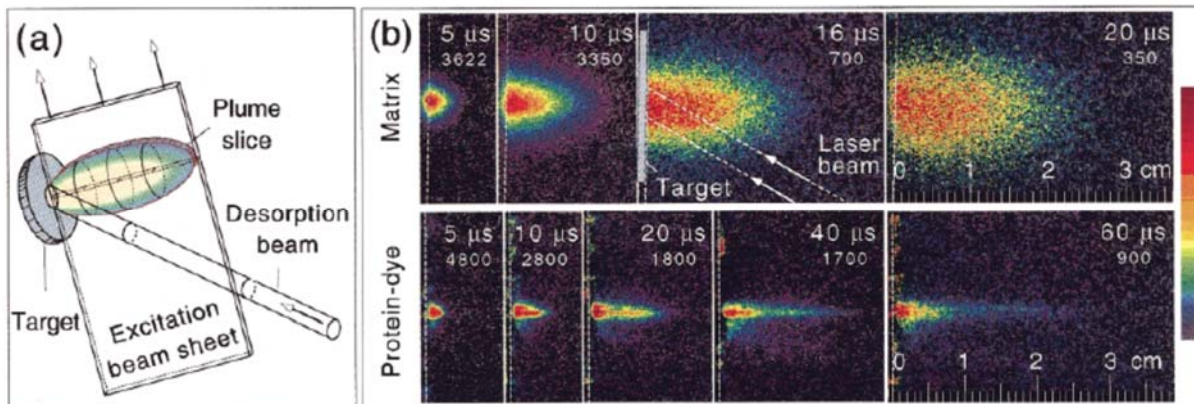


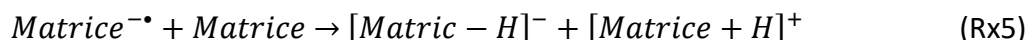
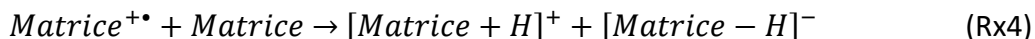
Figure 5. a) Schéma de la géométrie du panache d'expansion en fonction de la position du laser. b) Image CCD présentant le panache d'expansion suivant la désorption de la matrice et de protéines colorées en fonction du temps.¹⁹

1.3.3 L'ionisation

Le processus de formation d'ions par MALDI n'est pas encore totalement compris, mais deux hypothèses ont été émises : les ions sont préformés dans la solution matrice/analyte ou générés une fois désorbés dans la phase gazeuse. Il existe toujours deux modèles différents qui expliquent la formation des ions des analytes qui ont été acceptés par la communauté scientifique. Le premier modèle, plus vieux, est appelé le « Coupled Physical and Chemical Dynamics » (CPCD).²⁰ Celui-ci assume que les analytes sont sous forme neutre dans le panache d'expansion, et ce indépendamment de s'ils étaient incorporés dans la matrice sous forme neutre, ou s'ils ont été quantitativement neutralisés par leurs contre-ions respectifs via la dissociation d'agrégats après irradiation dans le cas où l'analyte était incorporé dans la matrice sous forme pré-chargé. Ce

modèle part de l'hypothèse de la photo-ionisation de la matrice, qui génère des ions de matrice protonés ou déprotonés.^{17, 21-22}

Photo-ionisation de la matrice selon le modèle CPCD²⁰⁻²¹ :



Il y aurait ensuite transfert de charge entre la matrice et les analytes (M) en phase gazeuse, pour former $[M + H]^+$ et $[M - H]^-$. Le problème lié à l'acceptation de ce modèle part du fait que des ions radicalaires de molécules de matrice sont observés dans les spectres MALDI obtenu avec un laser infrarouge. L'énergie des photons à ces longueurs d'onde est beaucoup plus petite, excluant donc la possibilité de la photo-ionisation de la matrice, le point de départ du modèle CPCD. Cependant, cette réfutation n'est pas suffisante pour détruire le modèle, puisqu'il est possible que le processus d'ionisation diffère si un laser infrarouge est utilisé versus un laser proche UV.²⁰


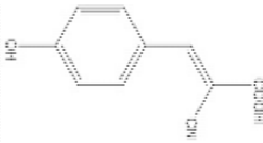
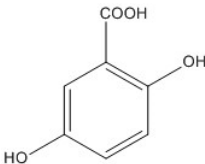
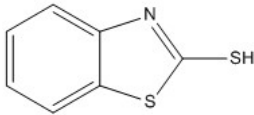
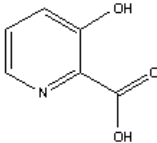
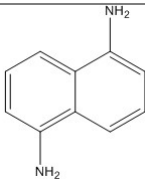
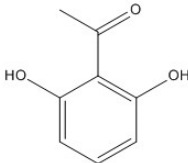
Le second modèle, appelé le « Lucky survivor » est plus récent.²³ Il assume plutôt que les analytes sont incorporés dans la matrice sous forme d'ions chargés, la plupart se neutralisant lors de la désorption de la surface irradiée.²³ Cette hypothèse provient du fait que les protéines gardent leur état de charge initial (en solution) une fois incorporées dans la matrice. En effet, il a été observé que les molécules indicatrices de pH garderaient leur couleur une fois incorporées dans les cristaux de matrice, et ce pour quelque matrice acide, neutre ou basique.²⁴ Les conditions de départ d'une analyse MALDI peuvent être très différentes selon l'échantillon à l'étude. En effet, il se peut que l'analyte soit simplement protoné, multi-protoné, déprotoné ou même chargé via son attachement à un ion quelconque, et ce avant son incorporation avec les cristaux de matrice. Alors, si l'analyte peut être incorporé dans la matrice et pré-chargé de différentes façons, pourquoi pratiquement toutes les espèces ioniques observées dans un spectre MALDI sont mono-chargés ? C'est ici que le modèle du « Lucky survivor » devient une

hypothèse intéressante. Celui-ci explique ce comportement via la neutralisation mutuelle par recombinaison des composantes cationiques et anioniques dans le panache d'expansion suivant la désorption. Les taux de neutralisation sont plus élevés lorsque l'état de charge initial d'un ion est plus élevé. Il est donc possible de croire que le taux de neutralisation d'un ion simplement chargé est beaucoup plus lent, et donc moins probable d'arriver. C'est pourquoi on appelle ces ions les « lucky survivor » du processus de neutralisation dans le panache d'expansion. Les ions, positifs ou négatifs, sont par la suite accélérés et extraits selon le voltage appliqué dans la source du spectromètre, et sont dirigés vers l'analyseur puis le détecteur. En bref, ce qu'il faut retenir des deux modèles présentés n'est qu'aucun d'eux n'est défini comme étant le seul processus permettant la formation d'ions dans une source MALDI. En effet, il est possible que les deux processus contribuent, de façon indépendante à la formation d'ions, et ce à des degrés restant encore à être déterminés.²⁰

1.3.4 Matrices MALDI

Le choix de la matrice est crucial pour une analyse MALDI. Les matrices MALDI doivent posséder certaines caractéristiques pour être efficaces. Tel que mentionné, ce sont des molécules organiques ayant une certaine aromaticité ainsi qu'une forte absorptivité molaire, ϵ , leur permettant d'absorber dans la gamme d'émission du laser utilisé. Elles se présentent généralement sous forme cristalline, et leur tension de vapeur se doit d'être assez basse, leur permettant de ne pas être volatilisées dès leur entrée dans la source sous vide ($\sim 10^{-7}$ mbar). De plus, les molécules de matrice doivent produire peu d'ions interférents en plus d'être idéalement inertes vis-à-vis les molécules présentes dans l'échantillon. Enfin, elles doivent être solubles dans le mélange de solvant utilisé et être de bons donneurs ou accepteurs de proton.⁹ Tel que mentionné plus haut, l'acide nicotinique a été la première molécule organique à être employée comme matrice pour l'analyse de protéines et de peptides. Depuis, plusieurs recherches ont été effectuées, menant à la découverte de molécules organiques beaucoup plus efficaces (Tableau 1), et ce pour l'analyse de différents types de biomolécules.

Tableau I. Principaux composés utilisés comme matrice en MALDI MS et leurs possibilités d'analyses.

Matrice	Structure	Poids moléculaire(Da)	Analyte
Acide sinapinique (SA) ²⁵		224,21	Protéines, peptides
Acide α -cyano-4-hydroxybenzoïque (CHCA) ²⁶⁻²⁷		189,17	Peptides, petites protéines, petites molécules, lipides
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) ²⁸⁻²⁹		154,12	Peptides, polymères synthétiques, protéines, polysaccharides, petites molécules,
2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT) ³⁰		167,25	Peptides, polymères synthétiques, protéines
Acide 3-hydroxypicolinique ³¹		139,11	Polynucléotides
1,5-Diaminonaphtalène (DAN) ³²⁻³⁴		158,20	Phospholipides, protéines, métabolites
2,6-Dihydroxyacetophenone (DHAP) ³⁵⁻³⁶		152,15	Glycopeptides, phosphopeptides, petites protéines

1.3.5 Laser et flux d'énergie en MALDI

En plus du choix de la matrice, plusieurs autres paramètres viennent influencer les processus de désorption et d'ionisation. En effet, la longueur d'onde et la durée d'impulsion du laser utilisé, le flux d'énergie du laser (fluence), le diamètre d'impact de ce dernier sur la surface (irradiance) et le ratio molaire matrice/analyte utilisé ont des effets importants sur ces processus de désorption et d'ionisation en MALDI. Plusieurs types de lasers, de l'UV lointain à l'IR lointain ont été utilisés dans les sources MALDI. Des lasers émettant dans l'IR de type Erbium : YAG ($\lambda_{\text{émise}} = 2940\text{nm}$) et CO_2 ($\lambda_{\text{émise}} = 10\mu\text{m}$) ont été utilisés, mais leur durée d'impulsion était très grande et la profondeur de pénétration dans l'échantillon était plus élevée, ce qui amenait à une sensibilité moindre. Les lasers du proche UV présentent l'avantage d'induire un très faible degré de produits photochimiques lors de l'irradiation, tels la formation d'adduits matrice-analyte.¹⁹ Les deux lasers les plus communs sont ceux à l'azote (N_2 , $\lambda_{\text{émise}} = 337\text{nm}$) et le Nd:YAG ($\lambda_{\text{émise}} = 355\text{nm}$). Le laser à l'azote a dominé le marché pendant des années, mais il présentait certains désavantages. En effet, la fréquence maximale pouvant être atteinte avec ce type de laser était limitée à environ 50Hz et leur durée de vie maximale ne dépassait pas les 10^7 tirs, ce qui n'était pas très pratique pour l'imagerie par MALDI MS.⁹ L'industrie s'est alors tournée vers les lasers de type Nd:YAG qui émettent à une longueur d'onde de 355nm. Ce type de laser permet aujourd'hui d'utiliser une fréquence d'au moins 2000Hz, générant des impulsions de l'ordre de quelques nanosecondes, et sa durée de vie maximale peut atteindre les 3,5 milliards de tirs.

Une analyse par MALDI MS nécessite l'apport d'une grande quantité d'énergie par unité de surface sur l'échantillon pour permettre la désorption et l'ionisation. Il est nécessaire d'avoir un certain minimum de flux d'énergie laser pour permettre la désorption thermique de la matrice. Pour la détection de l'ion moléculaire de l'analyte, il faut que ce flux d'énergie laser soit un peu plus grand que celui permettant la désorption de la matrice, sans toutefois être trop grand pour éviter d'induire sa fragmentation.^{29, 37-38} Ce seuil minimal dépend de plusieurs paramètres, dont l'identité de la matrice, ainsi que du ratio matrice/analyte. En effet, chaque matrice possède son propre seuil énergétique permettant sa désorption thermique, et ainsi produire et présenter un signal de l'analyte au détecteur. Une étude a démontré les moyennes du flux d'énergie

nécessaire à l'obtention d'un signal pour une protéine à différents ratios matrice/analyte.³⁹ Le seuil minimum du flux d'énergie laser nécessaire pour que la protéine cytochrome C soit analysé en prenant l'acide sinapinique comme matrice se situait à un ratio matrice/analyte de 4000 : 1.³⁹ Des ratios significativement plus ou moins grands demandaient un minimum de flux d'énergie laser pouvant être jusqu'à deux fois plus élevé. En effet, plus la concentration de l'analyte est faible, plus le volume d'échantillon soumis à l'ablation doit être grand pour générer assez d'ions moléculaires de l'analyte, et donc permettre l'obtention d'un signal. De plus, à des faibles ratios moléculaires matrice/analyte, il y a moins de molécules de matrice présentes sous la surface d'ablation du laser, permettant d'absorber l'énergie photonique émise. Il y a donc moins d'énergie déposée par unité de surface et l'énergie laser doit être augmentée pour permettre de déposer la quantité d'énergie minimale requise pour permettre la désorption.

1.4 L'analyseur par temps de vol

Le premier analyseur par temps de vol (TOF) a été décrit et breveté par William E. Stephens en 1946.⁴⁰ Rapidement, plusieurs autres chercheurs ont repris le concept de Stephens, et c'est en 1955 que le premier spectromètre de masse avec un analyseur TOF est introduit sur le marché.⁴¹ Les premières générations d'analyseurs par temps de vol étaient construites pour des instruments de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse (GC-MS).⁴²⁻⁴⁴ Cependant, ils se sont rapidement faits dépassés et remplacés par des analyseurs de types quadripolaires pour le couplage à la chromatographie gazeuse. En effet, les premiers analyseurs par temps de vol avaient une résolution très limitée et étaient très dispendieux. Ils ont donc été rapidement oubliés jusqu'à dans les années 80, et ce, en grande partie dû au développement de la source pulsée MALDI.

Une fois les ions formés dans l'espace source du spectromètre, ceux-ci seront d'abord accélérés dans un champ électrostatique de courte dimension (quelques millimètres), puis séparés selon leur ratio masse sur charge par l'analyseur avant leur entrée en contact avec le détecteur. Sur la figure 6, on peut voir qu'il faut un certain temps à un ion pour que celui-ci

traverse la source (d_{source}) et la zone libre de champs (d_{tof}), et que ce temps est également dépendant de la vitesse à laquelle l'ion parcourt cette distance. L'équation 2 nous démontre cette étroite relation, où t représente le temps, d est la distance totale parcourue ($d = d_{source} + d_{tof}$) et v , la vitesse de l'ion.

$$t = d/v \quad [2]$$

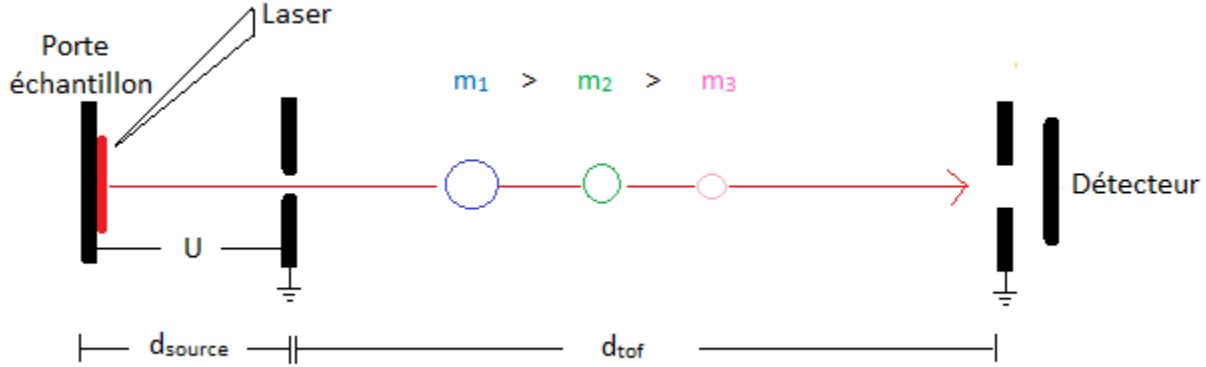


Figure 6. Schéma d'un tube de temps de vol linéaire

Dans la source, il y a une différence de potentiel stable appliquée, U , typiquement entre 20 et 25kV, entre le porte-échantillon (porté au potentiel) et l'électrode d'extraction. Les ions sont d'abord accélérés selon l'équation 3, où a représente l'accélération, E étant le champ électrique, q la charge de l'ion et m , la masse de l'ion. Il est donc possible d'obtenir la position de l'ion dans la source en effectuant la double intégrale de l'accélération selon le temps, tel que montré par l'équation 4. Cette intégrale permet d'obtenir l'équation 5 où d_0 représente la position initiale et v_0 représente la vitesse initiale des ions dans la source. Finalement, si d_0 et v_0 sont considérés infiniment petits, il est possible d'obtenir le temps passé dans la source (t_s) avec l'équation 6.

$$a = Eq/m \quad [3]$$

$$d_{source} = \iint a \, dt \quad [4]$$

$$d_{source} = d_0 + v_0 t + 0,5 \left(\frac{Eq}{m} \right) t^2 \quad [5]$$

$$t_s = \sqrt{\frac{2d_{source}m}{qE}} \quad [6]$$

Une fois que les ions quittent l'espace source, ceux ayant la même charge devraient idéalement posséder la même énergie cinétique selon l'équation 7, où U représente le potentiel d'accélération. Ils entrent ensuite dans la zone libre de champs, d'une longueur d_{tof} fixe, variant typiquement entre 1 et 2 mètres, selon l'instrument. Il est également possible de déterminer le temps de dérive des ions dans cet espace libre de champs, selon l'équation 8. En conséquence, l'équation 9 représente le temps qu'un ion met à parcourir la distance totale suite à sa production. En convertissant le potentiel d'accélération en différence de potentiel P , selon l'équation 10, où eV représente l'énergie de l'électron, et en simplifiant l'équation du temps de dérive des ions selon le fait que ceux-ci passent un temps infiniment plus petit dans la zone source, il est possible d'obtenir la masse de l'ion selon l'équation 11.⁴⁵

$$E_c = qU = \frac{1}{2} mV^2 \quad [7]$$

$$t_{tof} = \frac{d_{tof}}{V} = d_{tof} \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad [8]$$

$$t_{vol} = \sqrt{\frac{2d_{source}m}{qE}} + d_{tof} \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad [9]$$

$$U = eVP \quad [10]$$

$$m = \frac{2t_{vol}^2 qeVP}{d_{tof}^2} \quad [11]$$

D'abord considéré comme des analyseurs à faible résolution, plusieurs améliorations au fil du temps ont permis à ces analyseurs par temps de vol de se tailler une place importante dans les spectromètres de masse d'aujourd'hui.⁴⁵ La résolution spectrale observée diminue lorsque des ions de mêmes masses n'arrivent pas tous au détecteur au même moment. Deux raisons majeures peuvent justifier cette diminution de résolution. D'abord, les ions produits par MALDI sont éjectés avec une vitesse initiale ($\sim 400\text{ms}^{-1}$) qui induit donc des dispersions d'énergie cinétique initiales, ce qui induit des vitesses, et donc des temps de vol légèrement différents pour des ions de mêmes masses.⁴⁶⁻⁴⁷ De plus, il est également possible d'observer des dispersions dans la distribution spatiale initiale des ions, amenant une fois de plus ces ions à entrer le tube de vol avec des énergies cinétiques légèrement différentes. Selon l'équation 12 portant sur la définition de la résolution dans un analyseur de type temps de vol, il est possible de constater qu'un accroissement de résolution peut être obtenu par la diminution de la dispersion temporelle (Δt) et spatiale (Δx) des ions ainsi que par une augmentation de la longueur du tube (D). Dans les années 50 et 60, plusieurs scientifiques s'appliquaient à la conception de nouvelles sources d'ionisation permettant de limiter les dispersions d'énergie cinétique des ions, mais sans réel succès. D'autres scientifiques ont alors plutôt choisi de se pencher sur la neutralisation des effets de cette dispersion énergétique. Deux améliorations majeures ont permis de corriger les vitesses des ions, soit l'utilisation d'une extraction retardée des ions et de l'ajout d'un réflectron.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \simeq \frac{D}{2\Delta x} \quad [12]$$

L'ajout d'un réflectron, ou miroir électrostatique, s'est présenté comme l'amélioration la plus importante dans les analyseurs TOF. Le réflectron permet de corriger les dispersions d'énergie cinétique des ions acquises lors du processus de désorption/ionisation et de l'accélération initiale. Le principe de vouloir améliorer la résolution des TOF via l'introduction d'un miroir électrostatique à l'extrémité de la zone libre de champ a d'abord été conceptualisé dans le milieu des années 50 par Alikhanov⁴⁸, puis développé et implanté en 1973 par Mamyrin.⁴⁹ Un réflectron consiste en une série d'électrodes à un potentiel croissant permettant un ralentissement progressif des ions, puis leur ré-accélération dans le sens opposé tel que montré

à la figure 7. En effet, les ions pénètrent dans le réflectron jusqu'à ce qu'ils possèdent une énergie cinétique égale à zéro, puis ils sont ensuite accélérés et expulsés dans le sens opposé vers le détecteur. Les ions ayant une énergie cinétique plus grande à leur entrée dans le réflectron pénétreront plus profondément, et passeront donc plus de temps dans celui-ci par rapport à ceux de plus faible énergie cinétique.

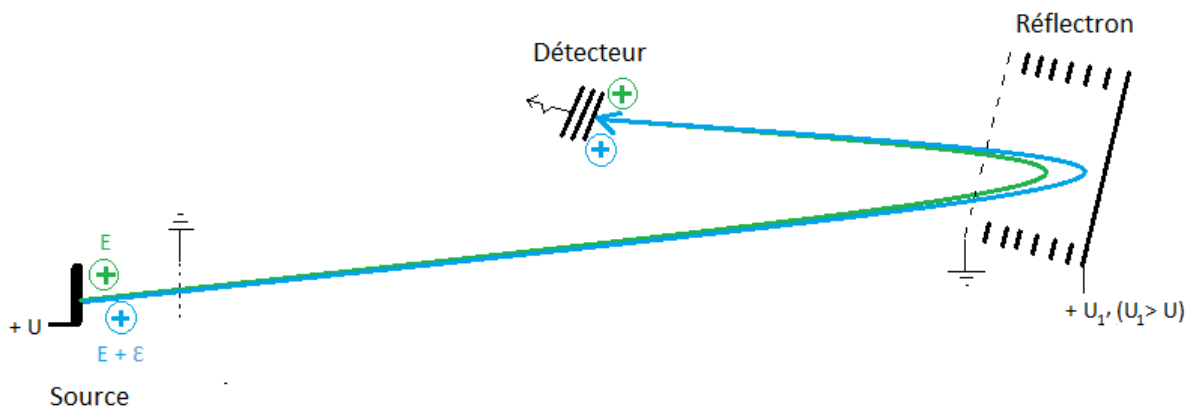


Figure 7. Schéma d'un spectromètre de masse par de temps de vol avec un réflectron

Il existe 2 principaux types de réflectrons, soit le réflectron à champ uniforme et le réflectron à deux étages. Le réflectron à champ uniforme est composé d'une série d'électrodes à potentiel croissant entre l'entrée de la grille et la fin du réflectron formant un champ électrique de croissance linéaire. Ceux à deux étages comprennent deux champs de retardement à croissance linéaire séparés par une électrode intermédiaire. Le champ dans la première section est significativement plus élevé que dans la deuxième section, ce qui fait que les ions perdent au moins le 2/3 de leur énergie sur le 1/10 de la longueur du réflectron.⁵⁰ Un réflectron à deux étages permet donc une focalisation d'énergie sur une plus grande gamme d'énergie cinétique initiale, en plus d'avoir l'avantage d'être de plus faible dimension en comparaison à celui à champ uniforme. Il existe également un troisième type de réflectron, soit celui à champs paraboliques, mais qui est que très peu utilisé. Celui-ci possède un nombre élevé d'électrodes, formant un champ de croissance exponentielle, permettant une meilleure définition du champ

électrostatique.⁵¹ Cependant, cela augmente leur longueur et de ce fait diminue leur transmission. Somme toute, le réflectron a l'avantage d'augmenter le temps de vol des ions, et ce sans augmenter la dimension de l'instrument. Il consentit donc un moyen de corriger substantiellement les temps de vol d'ions de même masse, mais d'énergie cinétique différente, et permet une meilleure résolution dans les analyseurs TOF.⁵²

L'extraction retardée a été décrite en 1955 par Wiley et McClaren, et se base sur le principe d'accorder un bref délai entre la formation des ions dans la source et leur extraction/accélération, corrigeant ainsi principalement la distribution spatiale initiale des ions.⁴¹ La première installation d'une telle amélioration sur un TOF date cependant de 1995.⁵³ Dans une source ionique à deux étages, cette amélioration consiste donc à extraire tous les ions du premier étage de la source maintenu sans champ suite à l'attente d'un temps fixe. Cela permet aux ions de se disperser dans la source pendant un certain temps (~ 100 ns) dans un espace libre de champ. Le délai d'attente doit être optimisé selon la gamme de masse à l'étude (Figure 8.a). L'extraction des ions se fait dans le premier étage après la période de délai par un saut rapide de potentiel sur l'électrode intermédiaire (Figure 8.b). Les ions étant les plus près de la source recevront alors une énergie plus grande, et seront donc plus accélérés, permettant ainsi aux ions situés à différentes positions dans la source d'être focalisés en temps sur le détecteur (Figure 8.c).⁵⁴ Cela permet également d'assurer que les différentes réactions et processus d'ionisation sont terminés avant l'accélération.

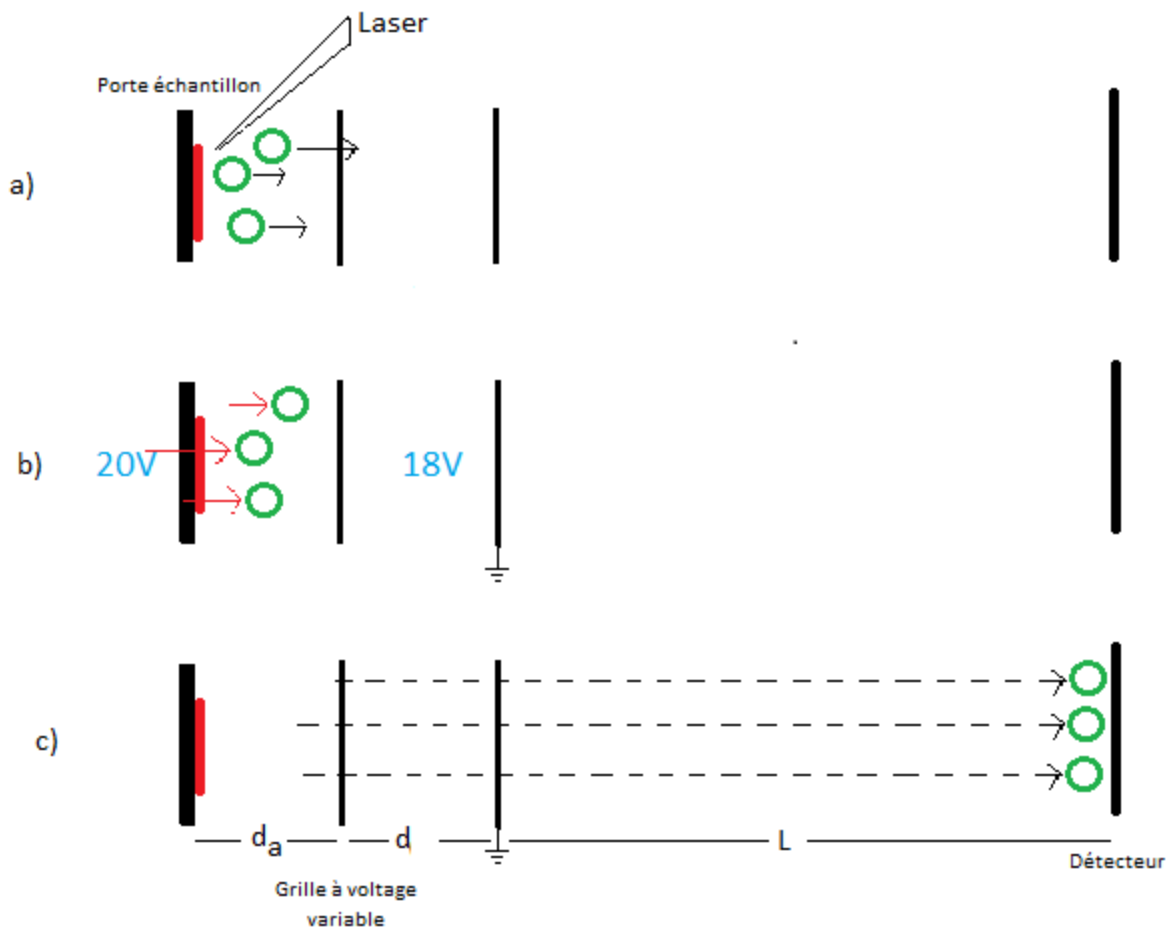


Figure 8. a) Dispersion des ions suite à l'impulsion laser durant le délai avant l'extraction. b) Gradient de voltage appliqué entre les deux grilles permettant aux ions près de la source d'être accélérés davantage. c) Les ions de plus faibles vitesses rejoignent les plus rapides pour tous arriver au détecteur en même temps.

Pour optimiser la résolution à une masse donnée, l'ajustement du délai d'extraction τ peut se faire selon l'équation 13, où d_a représente la longueur du premier champ d'accélération en mm, m la masse de l'ion en daltons, z la charge de l'ion, V_x l'amplitude du pulse d'extraction en volt, T_0 , l'énergie cinétique initiale la plus probable en électronvolts et où w est obtenu à l'aide l'équation 14.⁵⁴ Dans cette équation, x correspond à V_x/V_1 , où V_1 représente le potentiel appliqué

sur la grille intermédiaire, d_0 la distance du deuxième champ d'accélération et L la distance de la zone libre de champ.

$$\tau = 0.144 d_a (m/z V_x)^{1/2} [1/w + (T_0/V_x)^{1/2}] \quad [13]$$

$$w = (x/1 + x)^{3/2} [(L/2d_a) - (d_a/d_0)(1 + x)] + x (d_0/d_a) - 1 \quad [14]$$

Le délai entre l'ionisation et l'extraction des ions ainsi que l'amplitude du pulse utilisé sont des paramètres pouvant être ajustés séparément pour maximiser la résolution à une masse donnée. Pour un pulse d'extraction donné (V_x), il est nécessaire d'augmenter le temps du délai pour optimiser la résolution d'ions de plus grandes masses. Pour des ions de relativement faibles masses, le délai d'extraction est approximativement proportionnel à la racine carrée du m/z . Si l'optimisation doit s'effectuer sur un ion de masse plus élevée, il est également possible d'augmenter la valeur du pulse d'extraction tout en maintenant le délai d'extraction constant.

Finalement, la figure 9 nous permet de voir l'effet réel des deux grandes améliorations qu'ont été le délai d'extraction et l'ajout d'un réflectron, en plus de voir l'effet du dernier paramètre de l'équation 12, soit la distance de parcours des ions D sur la résolution spectrale.

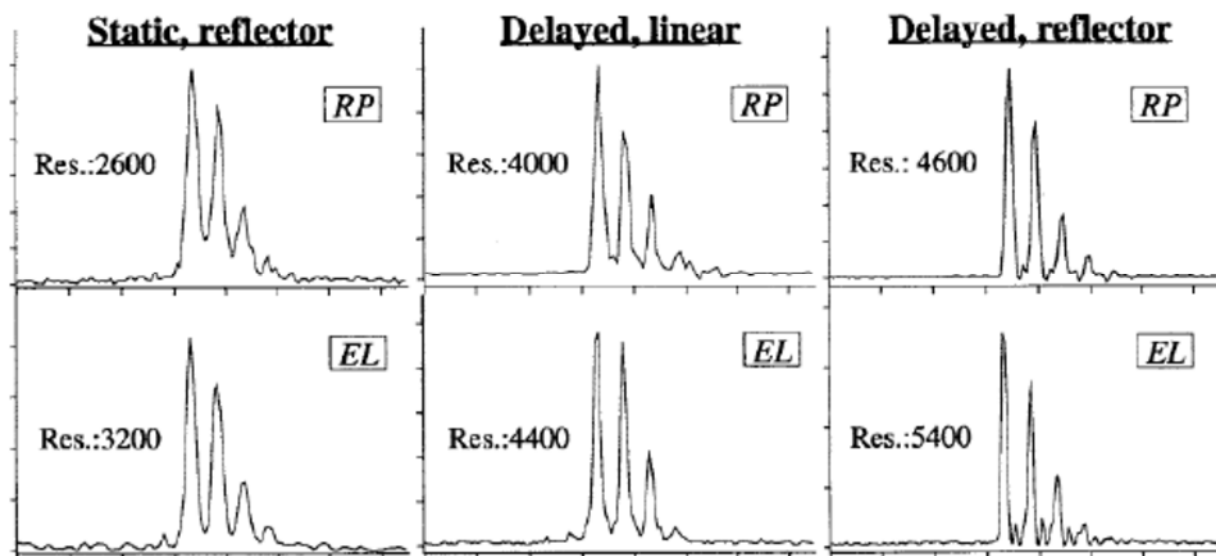


Figure 9. Comparaison de spectres MALDI-TOF MS obtenus pour l'angiotensine I (m/z 1296.68) quand l'acquisition est faite en utilisant un champ d'extraction constant (static) et un réflectron (reflector), en utilisant l'extraction retardée (delayed) en TOF linéaire (linear), puis finalement en combinant l'extraction retardée et un réflectron. Le parcours des ions à travers le tube de temps de vol en mode linéaire est de 1,3 mètres et 2,0 mètres en mode réflectron. b) Comparaison des mêmes paramètres d'acquisitions, mais avec un parcours des ions à travers le tube de temps de vol en mode linéaire est de 2,0 mètres et 3,0 mètres en mode réflectron.⁵⁴

Théoriquement, les analyseurs TOF sont considérés comme étant sans limite au niveau de la taille des m/z pouvant être accélérés et traverser la zone libre de champ pour se rendre au détecteur.⁵⁵⁻⁵⁶ Cependant, certaines limitations sur un instrument MALDI-TOF MS existent et sont principalement dues à la baisse de l'efficacité de détection avec l'augmentation du poids moléculaire.⁵⁷

1.5 Spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à sélectionner un ion d'intérêt, puis de le fragmenter afin d'obtenir des informations quant à sa structure moléculaire. Pour se faire, deux analyseurs doivent être combinés. Par soucis de concision, seule la spectrométrie de masse en tandem par MALDI TOF/TOF sera expliquée.⁵⁸ Dans le système utilisé, une cellule 'LIFT' vient s'insérer dans le parcours des ions, permettant de ségréger le tube de temps de vol initial en deux temps de vol distincts (figure 10). Les différents ions sont séparés selon leur m/z dans le premier TOF. En MALDI MS/MS, la puissance laser appliquée sur l'échantillon étant plus grande, une partie des ions subissent une fragmentation métastable dans le premier TOF. Ce mode de fragmentation se fait donc via un processus de dissociation des ions induite par l'accumulation d'un excédent d'énergie interne acquit lors de l'étape de désorption/ionisation (fragmentation métastable). Il est à noter que l'activation de la fragmentation est également disponible via l'utilisation d'une cellule de collision. Ce mode de fragmentation est complémentaire à la fragmentation métastable permettant la dissociation activée par collisions (CAD) avec des molécules d'un gaz inerte, typiquement l'argon, et les ions moléculaires provenant de l'échantillon.⁵⁸ L'ion d'intérêt, soit le précurseur, et ses fragments ont alors la même vitesse de parcours et peuvent être sélectionnés simultanément par la porte ionique de la cellule LIFT. Ceci est possible via la désactivation rapide d'une différence de potentiel appliqué à la fin du premier TOF. L'ensemble des ions sont ensuite ré-accélérés dans la source du deuxième TOF (en mode réflectron) dans la cellule LIFT et un spectre MS/MS est obtenu. Il y a aussi la possibilité de défléchir les ions précurseurs à la sortie de la cellule LIFT pour éviter leur fragmentation métastable induite par des collisions dans la région du deuxième TOF. De plus, le fait d'éliminer les ions précurseurs restants permet également de maximiser la détection des ions fragments. Un spectre MS/MS somme représentant l'accumulation initiale du précurseur et l'accumulation des ions fragments est alors généré.

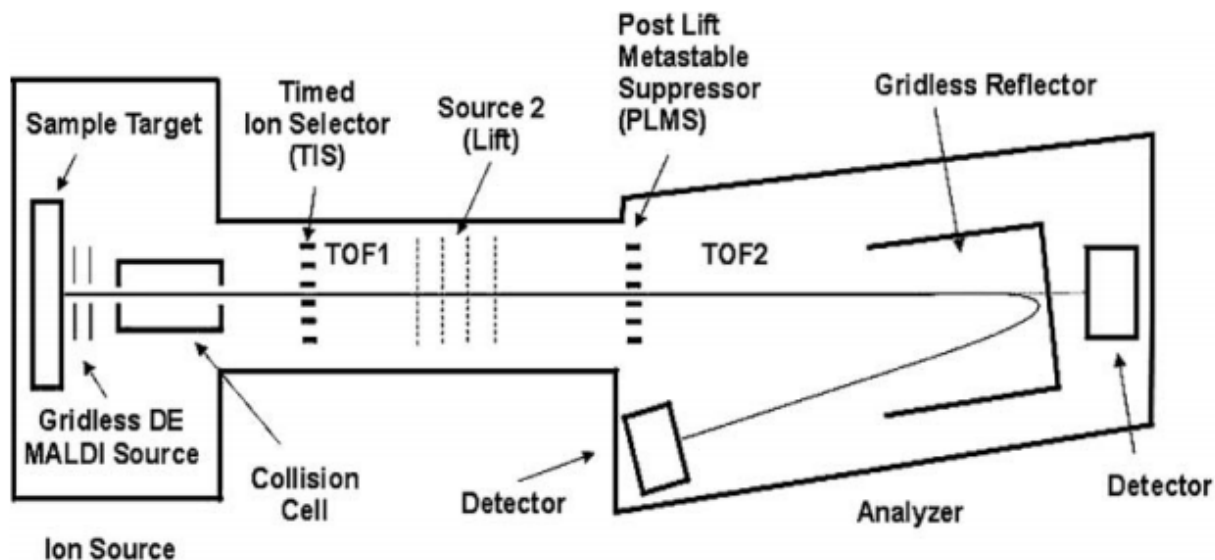


Figure 10. Schéma d'un spectromètre de masse MALDI LIFT-TOF/TOF⁵⁸

1.6 L'imagerie par spectrométrie de masse

L'imagerie MS est une approche qui permet la mesure de la composition et de l'abondance des molécules de façon régiospécifique dans la gamme de m/z analysée, et ce, sur une superficie préalablement choisie. Dans la région choisie, des mesures sont prises de façon ponctuelle dans un système de coordonnées cartésien. Pour chaque m/z , les données acquises sont donc représentées par une coordonnée en x/y (pixel) ainsi que par l'intensité (i) du signal qui est proportionnel à l'abondance de cette molécule. Cette représentation peut être visualisée avec différents systèmes de couleurs et il est donc possible de construire une image pour chaque molécule et ainsi déterminer l'intensité relative d'un m/z choisi pour chaque pixel analysé. Le principal avantage de ce type d'imagerie réside dans le fait qu'aucun marqueur moléculaire n'est nécessaire, à l'instar de l'imagerie par fluorescence par exemple. De plus, les techniques d'imagerie moléculaire, telles que l'imagerie par résonance magnétique (MRI) et par émission de positons (PET) ne ciblent que des classes de molécules, tout en étant peu spécifiques à travers celles-ci.⁵⁹

Il existe trois différentes techniques majeures d'imagerie MS, soit par MALDI, par ions secondaires (SIMS) et par désorption/ionisation via électrobulbation (DESI). L'imagerie MS par SIMS a été l'une des premières à être développée.⁶⁰ Elle permet d'atteindre de très hautes

résolutions spatiales, jusqu'à 50nm, en balayant la surface de l'échantillon avec un faisceau d'ions primaires. Cependant, la gamme de masse pouvant être analysée est limitée à des m/z d'environ 1000, et la fragmentation de molécules organiques est souvent observée.⁶¹⁻⁶² L'imagerie MS par DESI est une méthode instrumentale regroupant les principes de l'ESI et de l'ionisation par désorption. En effet, un nébulisat de fines gouttelettes électriquement chargées est bombardé sur la surface de l'échantillon à analyser, et cet impact amène la production d'ions en phase gazeuse du matériel présent sur cette surface.⁶³ Cette technique permet surtout l'analyse de lipides chargés et aucun prétraitement d'échantillon n'est nécessaire.⁶⁴⁻⁶⁵ L'imagerie MS par MALDI est la technique la plus utilisée en imagerie MS, principalement en raison de la large gamme de masse pouvant être analysée, en plus de minimiser la fragmentation des ions.⁶⁶⁻⁶⁷ Cependant, les résolutions spatiales pouvant être atteintes (~quelques μm) sont plus faibles qu'en SIMS. Seule l'imagerie par MALDI sera expliquée en détail ici, puisque c'est cette technique qui fut utilisée pour les travaux de recherches présentés au chapitre 2.

L'imagerie de sections tissulaires minces par MALDI, permettant la localisation de certains peptides et protéines, a d'abord été introduite en 1997 par le groupe de Richard Caprioli.⁶⁸ Depuis, le domaine est en expansion constante, et la technologie a été utilisée pour évaluer la distribution spatiale d'une grande variété de biomolécules, tels des lipides, des composés pharmaceutiques et des métabolites.⁶⁹⁻⁷¹ De plus, plusieurs avancées dans le développement de méthodes dédiées à l'imagerie MS par MALDI ont permis une augmentation de l'information moléculaire et spatiale.⁷²⁻⁷³ La plupart des expériences d'imagerie par MALDI rapportent des résolutions spatiales de l'ordre de 30 à 200 μm . La très haute résolution est cependant désormais possible ($\leq 10\mu\text{m}$), et ce grâce à de nombreux développements instrumentaux, principalement la taille du faisceau laser sur l'échantillon et la vitesse d'acquisition, ainsi qu'aux avancées liées à la préparation d'échantillons.⁷⁴ L'optimisation de la préparation d'échantillon permet aujourd'hui d'obtenir de l'information reproductible de grande qualité, et ce, sur un nombre croissant d'échantillons variés, permettant ainsi d'utiliser la technique dans plusieurs domaines de recherches différents.

1.7 Préparation des échantillons pour l'imagerie MS par MALDI

Les méthodes de préparation d'échantillons sont considérées comme étant des étapes cruciales amenant au succès de la détection des molécules d'intérêts lors d'une analyse par MALDI MS.⁷⁵⁻⁷⁶ La figure 11 présente les cinq étapes d'une expérience d'imagerie MS par MALDI, soit la coupe et la fixation d'une section tissulaire mince sur une lame, les lavages (non évoqué sur la figure 11), la déposition de matrice, l'acquisition des données et le traitement de celles-ci.

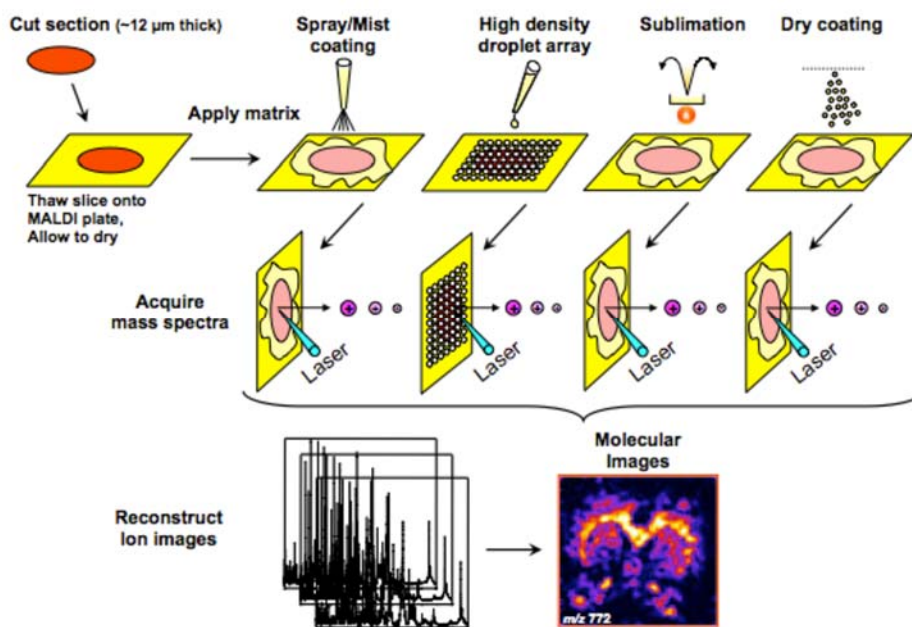


Figure 11. Étapes nécessaires pour la réalisation d'une expérience d'imagerie MS par MALDI.⁷⁷

1.7.1 Préservation des échantillons tissulaires par congélation

La préservation des échantillons, préalable à leur coupe, est un des paramètres les plus importants en vue d'obtenir des images de haute qualité représentant avec fidélité la composition moléculaire de l'échantillon tissulaire à l'étude. Le délai entre la collecte de l'échantillon vivant et sa préservation est crucial afin de limiter au minimum la dégradation moléculaire des bioanalytes présents dans l'échantillon.⁷⁸⁻⁷⁹ Différentes approches peuvent être utilisées pour préserver les échantillons permettant de minimiser la dégradation chimique. La

première est la congélation instantanée, qui consiste à l'immersion de l'échantillon dans une solution cryogénique, tel l'azote ou l'isopentane liquide. Cette méthode est relativement simple et permet de conserver la forme tridimensionnelle des échantillons, tout en minimisant leur dégradation puisque la congélation se fait rapidement.⁸⁰ Cependant, il faut être prudent avec cette technique, puisqu'il a été rapporté que certains organes mammaliens, tel le cerveau, avaient tendance à fissurer suite au choc thermique dû à une immersion trop rapide.⁸¹

Une méthode considérée plus douce peut également être utilisée pour la congélation des échantillons. Celle-ci consiste plutôt à déposer l'échantillon sur un 'bateau' fait de papier aluminium flottant sur le liquide cryogénique.⁸² Pour s'assurer d'une préservation parfaite de la forme de l'échantillon, mais en ayant une congélation plus lente, il est également possible de mettre l'échantillon tissulaire sur une feuille d'aluminium déposée sur glace sèche. Enfin, une autre méthode peut également être utilisée pour la préservation des échantillons, soit l'encastrement de ces derniers dans un polymère. Dans ce cas, l'échantillon prélevé est immergé dans un polymère liquide à température pièce, soit du polyéthylène glycol (PEG), de marque commerciale « *Optimal Cutting Temperature (OCT)* » ou sous le nom de « *Neg-50TM* ». L'échantillon immergé dans le polymère liquide est ensuite congelé, d'abord à -20°C (par exemple dans le cryostat), puis au moins 24 h à -80°C. Il faut également être prudent avec cette technique, puisque la majorité des polymères utilisés pour l'encastrement sont facilement détectables par MS dans une gamme de masse inférieure à m/z 2000 et leur présence peut amener de l'interférence et une grande suppression ionique de certaines molécules d'intérêts à l'étude.⁸³ Cependant, pour certains échantillons, il est inévitable d'utiliser l'encastrement pour arriver à réussir une découpe tissulaire de qualité. Étant donné que la plupart des polymères dédiés à l'encastrement sont solubles dans l'eau, certains lavages permettant d'en enlever une majeure partie ont été optimisés.⁸¹ Une fois les échantillons congelés par l'une des méthodes décrites, il est alors possible de les conserver à -80°C pour une longue période de temps sans dégradation majeure de ceux-ci.

1.7.2 Découpe des échantillons en sections minces

La découpe d'échantillons en sections minces se fait à l'aide d'un cryostat maintenu à température négative ($\sim -20^{\circ}\text{C}$). L'échantillon est monté sur un support amovible à l'aide d'une goutte d'OCT. La température de la tête du cryostat est généralement réglée autour de -15°C , mais la température exacte de coupe dépend du type d'échantillon, voire même du type de tissus à l'étude. Pour la majeure partie des applications, des coupes pouvant varier entre 5 et $20\mu\text{m}$ d'épaisseur sont effectuées. En effet, peu de différences spectrales ont été observées sur cette gamme d'épaisseurs de coupes.⁸¹ Cependant, il a été démontré que lorsque la matrice est déposée à des fins d'imagerie MS, via par exemple par nébulisation, l'épaisseur des sections devient un facteur important et la qualité des signaux en est affectée.⁸⁴ En effet, l'intensité et le nombre de signaux observés augmentent drastiquement avec la diminution de l'épaisseur. Il est donc préférable d'avoir des coupes d'épaisseurs se situant entre 2 et $10\mu\text{m}$ pour augmenter la qualité des résultats en imagerie MS par MALDI.⁸⁴ De plus, il a été recommandé que l'analyse de molécules de hauts poids moléculaires, telles les protéines intactes, soit faite sur des sections très minces ($2\text{-}5\mu\text{m}$).⁸⁵ Cependant, il faut comprendre que plus l'épaisseur des sections désirées est mince, plus il est difficile de les couper et de les manipuler dans le cryostat.

Un des paramètres absolument nécessaires à la réussite d'une expérience d'imagerie MS par MALDI-TOF est le montage des sections tissulaires sur une lame conductrice permettant d'éviter l'accumulation de charge sur la lame suite induite par la différence de potentiel appliquée en source. Historiquement, les sections étaient montées sur des lames métalliques d'aluminium, d'acier inoxydable ou recouverte d'or.⁸¹ Les lames d'or offrent l'avantage d'une meilleure adhérence de l'échantillon, et ce même si des lavages sont nécessaires. Cependant, les lames métalliques opaques ne sont pas compatibles avec la microscopie optique. Les lames généralement utilisées de nos jours sont des lames de verre recouvertes d'un mince film transparent d'oxyde d'étain et d'indium (indium tin oxide - ITO), les rendant ainsi conductrices tout en restant transparentes. Le principal avantage de ces lames est donc la possibilité d'obtenir pour une même section tissulaire des données liées à l'imagerie MS enregistrées par MALDI-TOF

MS, et de faire une évaluation par microscopie optique.⁸⁶ Ceci permet donc de compléter l'imagerie MS avec l'histologie des sections biologiques à l'étude.

Une fois la section tissulaire coupée, un pinceau d'artiste est utilisé pour la déplacer et la positionner jusque sur une lame, préalablement refroidie dans le cryostat. Le dessous de la lame est ensuite réchauffé avec un objet à température de la pièce introduit dans le cryostat afin de faire fondre et sécher la section sur la lame. Il est important de laisser se réchauffer le dessous de la lame au moins 30s dans le cryostat pour s'assurer que l'eau macroscopique contenue dans la section se soit évaporée. Une fois la section sèche, il est ensuite possible de retirer la lame du cryostat et de minimiser la condensation d'eau atmosphérique sur la section. Les lames sont ensuite déposées dans un dessiccateur pendant 30min avant d'effectuer un dépôt de la matrice sur la section.

1.7.3 Lavage des sections

Le lavage préalable des sections tissulaires a prouvé son utilité pour l'amélioration de la détection de certaines classes de molécules, et ce, en permettant la diminution de la suppression ionique pouvant être observée via la présence de sels et autres analytes non-désirés.^{68, 87} Un lavage permet donc d'améliorer la qualité des signaux d'intérêts tout en préservant leur distribution spatiale sur la section. Les lavages ne sont pas toujours nécessaires, et leur utilité dépend grandement du type d'analyte à l'étude. Ils ont principalement été utilisés en imagerie MS des protéines et des peptides via l'utilisation de solvants organiques afin d'éliminer les sels et une grande majorité de lipides. Plusieurs procédures de lavages pour les protéines ont été développées au fil du temps. Pour les plus communes, on retrouve celles se basant sur l'immersion successive des sections dans des solutions à base d'alcool, tels l'éthanol⁸¹ et l'isopropanol⁸⁷. D'autres procédures impliquent plutôt l'immersion dans un tampon de formate d'ammonium⁸⁸ ou dans une solution nommée Carnoy⁸⁹, à base d'éthanol, de chloroforme et d'acide acétique. Certains lavages ont également été développés à des fins plus spécifiques, par exemple pour le renforcement de la détection de petites molécules telles que les composés pharmaceutiques. En effet, l'ajustement du pH du tampon utilisé pour le lavage de sections, selon

la solubilité des composés, a permis d'améliorer fortement la limite de détection de certains composés pharmaceutiques.⁹⁰

1.7.4 Choix et mode de déposition de la matrice

Le choix de la matrice est également un paramètre très important, puisque celle-ci dicte la gamme de masse et la classe de biomolécules à l'étude. De plus, le choix du mode de déposition de la matrice est aussi un facteur crucial, puisqu'il faut s'assurer d'une extraction adéquate des analytes d'intérêts de la section s'effectue, sans toutefois induire une délocalisation de ceux-ci. L'étape de la déposition de matrice sur l'échantillon est donc critique, puisque la matrice, les solvants utilisés et la technique de déposition doivent être considérés avec précaution pour une expérience, et ce, selon les molécules d'intérêts à l'étude ainsi que la résolution spatiale désirée. La matrice peut être déposée sur l'échantillon via plusieurs techniques différentes, mais principalement, il existe deux approches génériques permettant de déposer celle-ci à des fins d'imagerie MS. La première passe par une déposition de matrice en solution par nébulisation sur la section, permettant ainsi l'extraction des molécules d'intérêts de la section. La seconde passe par une déposition de matrice sans solvant, via l'exploitation du principe de sublimation.

Différents systèmes automatisés commerciaux sont disponibles pour la déposition de matrice par nébulisation, tels que l'ImagePrep (Bruker Daltonics, Billerica, MA), le TM Sprayer™ (HTX Imaging) et le SunCollet (SunChrome). L'ImagePrep fait appel à la technique de nébulisation horizontale vibrationnelle d'une solution de matrice permettant d'atteindre des résolutions spatiales entre 25 et 100 μm pour l'imagerie de protéines sur sections. Une fois l'échantillon lavé et déshydraté, celui est déposé dans la chambre maintenue sous atmosphère d'azote, permettant de contrôler l'humidité. Un cycle de déposition de matrice contient trois étapes distinctes, soit la vaporisation de la matrice, l'incubation et le séchage. Ce cycle est répété à plusieurs reprises lors d'une déposition à des fins d'imagerie MS. Il est important d'avoir une incubation assez longue pour extraire les analytes d'intérêts, sans toutefois induire trop de délocalisation de ceux-ci. L'utilisation d'une interface liquide permettant l'extraction est absolument nécessaire pour les peptides et protéines. C'est ce paramètre ainsi que la taille et la

densité des cristaux de matrice formés une fois séchés qui dicte la résolution spatiale pouvant être pour l'imagerie MS. La quantité de matrice déposée est contrôlée via un senseur mesurant la diffusion de la lumière sur la lame, et la méthode est complétée, après plusieurs cycles, lorsque la différence entre la valeur initiale et finale de la diffusion de la lumière atteint celle définie par l'utilisateur.⁹¹

Le TM Sprayer et le SunCollect font également appel à la nébulisation d'une solution de matrice, mais verticalement. L'échantillon est déposé dans l'instrument, puis un moteur opérant en x et en y déplace la tête du capillaire au-dessus de la lame, permettant une couverture uniforme complète de celle-ci. L'un des avantages de ces systèmes réside dans le fait qu'il est possible de chauffer la solution de matrice au bout du capillaire, permettant à celle-ci de mieux pénétrer l'échantillon pour atteindre les analytes et favoriser la co-cristallisation. De plus, un mince courant d'azote sort en parallèle avec la matrice, permettant ainsi une évaporation plus rapide de la surface et donc la formation de cristaux de matrice plus petits.⁹²

La sublimation de matrice est une méthode de déposition assez récente permettant d'éviter l'utilisation de solvants et de minimiser ainsi au maximum la délocalisation des analytes. Elle est très utilisée pour l'imagerie MS de molécules à faibles poids moléculaires, principalement pour les lipides.^{34, 72} Il est donc possible de simplement sublimer une couche mince (quelques micromètres) et homogène de matrice avant l'acquisition des données. La plupart des systèmes de sublimation comportent un condensateur, une pompe à vide, un bain d'huile (ou de sable) ainsi qu'une trappe à froid, tel que présenté figure 12.

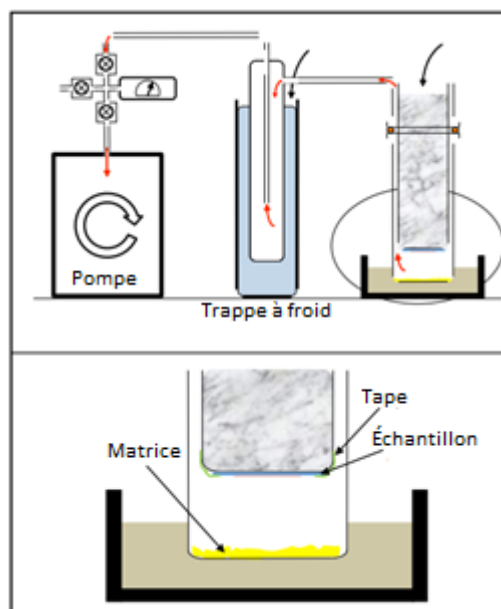


Figure 12. Schéma du système de sublimation assemblé au laboratoire.⁹³

Environ 300mg de matrice sont déposés dans le fond du condensateur, puis la lame est fixée sur la surface supérieure à l'aide de ruban adhésif. Le vide ($\sim 10^{-3}$ mBar) est fait à l'aide de la pompe et un mélange de glace et d'eau est introduit dans la partie supérieure du condensateur pour assurer un contact très froid avec la lame et la condensation de la matrice. Une fois la pression désirée atteinte, le condensateur est immergé jusqu'au niveau de la matrice dans le bain chauffant. La matrice se sublimera alors dans le condensateur et pourra aller se condenser sur la lame, le tout étant favorisé par la température proche de zéro degré. Plusieurs paramètres, tels que la température du bain chauffant et la pression atteinte dans le condensateur font varier la déposition. Une fois la température et la pression stabilisées, l'épaisseur de matrice déposée est généralement contrôlée par le temps. Le processus permet, en quelques min, d'obtenir une couche de matrice mince et homogène sur toute la lame. Il est possible d'estimer rapidement et simplement la quantité de matrice déposée par unité de surface en évaluant le poids de la lame avant et après sublimation. Ceci permet de vérifier que la quantité de matrice déposée par unité de surface soit approximativement toujours la même, assurant donc d'une certaine reproductibilité entre les analyses.

Il est possible d'imager les lipides en utilisant des techniques de déposition avec solvant. Cependant, tel que discuté précédemment, les résolutions spatiales pouvant être atteintes peuvent être limitées via ce type de technique. L'approche par sublimation permet l'imagerie MS à très haute résolution spatiale ($\sim 5\mu\text{m}$).⁷⁰ Plusieurs autres avantages sont liés à la préparation d'échantillon via la sublimation, tels que l'augmentation de la pureté de la matrice déposée, la formation de microcristaux de très faible dimension et l'homogénéité de la déposition. La plupart des systèmes de sublimation ayant été utilisés jusqu'à présent sont assemblés directement dans les laboratoires. Des systèmes de sublimation automatisés commencent cependant à être commercialisés, permettant un contrôle plus efficace sur l'épaisseur de matrice déposée.⁹⁴

Tel que mentionné précédemment, il est nécessaire d'avoir une interface liquide permettant l'extraction et l'imagerie MS de certaines molécules, particulièrement pour les protéines et les peptides. Une étape supplémentaire de réhydratation suivant la sublimation a initialement été développée par Bouschen *et al.*⁷³ Ils proposaient alors la possibilité de sublimation de trois matrices (CHCA, SA et DHB), puis une réhydratation en atmosphère saturée d'eau pour au moins 24 h, nommée recristallisation. Ce très long temps de recristallisation est le principal désavantage de cette méthode.⁹⁵ Une méthode semblable a ensuite été proposée par Yang *et al.* permettant l'imagerie MS de protéines jusqu'à un poids moléculaire de 30kDa, et ce, avec une résolution spatiale de $10\mu\text{m}$.⁹⁶ La recristallisation s'effectue en atmosphère saturée de 5% d'acide acétique, et ce, pour 4 min au maximum. Cette méthode permet donc l'imagerie MS à haute résolution de protéines de relativement haut poids moléculaire.

1.7.5 Acquisition des données

Une fois la matrice déposée sur la section, la séquence d'imagerie MS doit maintenant être mise en place. Cette séquence permet de dicter à l'instrument la région d'intérêt à analyser, les différents paramètres instrumentaux devant être utilisés et la résolution spatiale à laquelle l'acquisition de chaque spectre sur la section doit se faire. La première étape permettant de générer une telle séquence passe par l'obtention d'une image optique de la lame sur laquelle la

section à analyser est déposée. En liant cette image optique avec le logiciel d'imagerie, soit dans notre cas par l'intermédiaire du programme FlexImaging (Bruker Daltonics, Billerica, MA), il est possible de relier les coordonnées de l'instrument avec l'échantillon tissulaire et de délimiter la région d'intérêt à analyser. Ensuite, la méthode d'acquisition ayant des paramètres instrumentaux précis doit être choisie, ainsi que la résolution spatiale désirée. Le processus automatisé permettra ensuite l'acquisition des données point par point sur la totalité de la région d'intérêt. Chaque point correspond ensuite à un pixel d'imagerie, représenté par un spectre MS des molécules détectées à cette coordonnée précise. Avec le logiciel d'imagerie, il est ensuite possible de construire une image unique pour chaque m/z d'intérêt et ainsi d'observer son intensité relative en corrélation directe avec l'histologie de la section analysée.

1.8 Objectif de recherche

Plusieurs excellentes revues de littérature des dernières années décrivent les diverses applications découlant de l'imagerie MS par MALDI.⁹⁷⁻⁹⁹ Cependant, on y retrouve que très peu d'applications liées à l'imagerie d'échantillons non-mammaliens. Certaines applications dans le domaine de la biologie végétale commencent à faire leur apparition en imagerie MS par MALDI. *Burrel et al.* ont étudié la distribution de métabolites dans des graines de blé.¹⁰⁰ Leurs résultats montraient une distribution irrégulière de certains métabolites dans les graines de stades de développement différents et sous stress thermique. *Mullen et al.* ont pu faire la cartographie petites molécules, soient des herbicides, dans des tissus végétaux démontrant ainsi la diversité de la technique d'imagerie MS par MALDI.¹⁰¹ *Grassl et al.* ont démontré la pertinence et l'utilité de l'imagerie MS pour l'analyse de la distribution et la composition de certains peptides et protéines dans les plantes. Ils ont également discuté des principaux défis reliés à la préparation de ce type d'échantillon.¹⁰²

L'imagerie des animaux invertébrés commence également à faire son apparition dans la littérature. *Meriaux et al.* ont pu établir des bases quant aux processus moléculaires permettant au système nerveux central des sangsues de régénérer leur circuit synaptique suite à une lésion.¹⁰³ Ils ainsi ont permis l'identification d'un bon nombre de lipides et de protéines pouvant

contribuer, sous différents aspects, aux phénomènes complexes de régénération des nerfs dans la sangsue. Schey *et al.* ont combiné l'imagerie MS par MALDI avec le séquençage par LC-MS pour localiser spatialement et identifier des protéines dans les muscles abdominaux d'un modèle invertébré, soit la crevette blanche du Pacifique.¹⁰⁴ De plus, Van Amerongen *et al.* ont étudié les lipides présents dans la tête du poisson zèbre, permettant de conclure que la composition des lipides dans ce modèle est très similaire à celle du cerveau humain.¹⁰⁵ Le poisson zèbre pourrait donc servir de modèle pour la recherche sur les maladies affectant les lipides dans le cerveau humain. Bhandari *et al.* ont visualisé la distribution de composés naturels, dans une section tissulaire d'un modèle de scarabée, qui suite à un contact sont responsables des fortes démangeaisons causées sur la peau des humains.¹⁰⁶ L'étude des interactions entre les différentes sphères du domaine de la biologie est importante pour comprendre certains mécanismes d'action. L'imagerie MS par MALDI s'avère est une technique très pertinente permettant d'obtenir un très grand nombre d'informations pour ce type d'étude.

Le modèle animal utilisé pour l'imagerie MS dans les travaux de recherches présentés dans les prochains chapitres est un lépidoptère de la famille des Noctuidae, soit *Spodoptera exigua*. Les lépidoptères sont un ordre d'insectes dont la forme adulte est communément appelée papillon, et dont la larve est appelée chenille. Le modèle à l'étude est sous forme de larve, et le terme chenille sera utilisé pour le reste du présent mémoire, afin de simplifier l'écriture. Les chenilles sont considérées comme des animaux à corps mous, c'est-à-dire des invertébrés. Les animaux à corps mous n'ont pas tous la même morphologie, et pour certains, le maintien de la pression fluidique dans les cavités internes de ceux-ci est limité par des facteurs physiologiques et mécaniques. Les chenilles diffèrent grandement de certains autres invertébrés, tels les vers, puisque leurs cavités internes sont remplies d'air.¹⁰⁷ Les chenilles de la famille des Noctuidea sont généralement considérées comme ravageuses pour certaines plantations, et le *Spodoptera exigua* est particulièrement dommageable pour les plantations de coton, de maïs, de laitue, de céleri et de tomates.¹⁰⁸ Sans surprise, cette espèce a été soumise à une longue histoire de traitement avec des insecticides, mais sans réel succès puisque le développement de leur résistance à ces différents insecticides est rapide.¹⁰⁹ Il est donc très intéressant de pouvoir obtenir des données quant à la composition moléculaire de cette espèce, permettant de mieux

comprendre leurs différents mécanismes biologiques. L'objectif de ce mémoire reposait donc sur l'optimisation de différentes méthodes de préparation d'échantillon à des fins d'imagerie sur ce modèle animal non-traditionnel. Cet échantillon présente une histologie, donc une hétérogénéité moléculaire importante ne permettant pas une optimisation aisée. Un tissu contrôle a donc été utilisé en parallèle pour l'optimisation de la préparation d'échantillon par sublimation/recristallisation. Le tissu contrôle est un homogénat de foie artificiel présentant une homogénéité moléculaire dans toutes les orientations, le rendant donc idéal pour le développement de méthode.

Des données quant à la distribution de différentes protéines et phospholipides à travers la chenille seront présentées dans les prochains chapitres. Ceci pourrait ainsi éventuellement permettre de trouver une façon de limiter leurs dégâts sur des plantations déjà fragiles, et ce, tout en minimisant les effets négatifs des insecticides chimiques utilisés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1 Préparation d'un homogénat de foies de souris

L'expérimentation animale a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Montréal. Les souris (15 jours) ont été euthanasiées par asphyxie au CO₂. La dissection s'est faite directement après le sacrifice pour ainsi minimiser la dégradation chimique dans les tissus. Les organes disséqués étaient ensuite rapidement déposés sur un papier d'aluminium sur glace sèche, permettant une congélation lente, mais sans fissure. Ces derniers étaient ensuite conservés dans un papier d'aluminium à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour la préparation d'un bloc de foie homogène, la procédure décrite par Groseclose et Castellino a été suivie.¹¹⁰ Des sections de 12µm de l'homogénat ont par la suite été découpées dans un cryostat Leica CM3050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), puis montées sur des lames ITO.

2.2 Préparation des chenilles

Les chenilles *Spodoptera exigua* aux 3^{ième} et 4^{ième} stades larvaires ont été obtenues via une collaboration avec la faculté d'agriculture et sciences environnementales de l'Université McGill. Les chenilles ont été sacrifiées en les plaçant sur une feuille d'aluminium déposée sur glace sèche. Une fois congelées, les chenilles ont ensuite été conservées dans un papier d'aluminium à -80°C, et ce jusqu'à leur utilisation. La découpe des chenilles a été faite après encastrement dans l'OCT, puis recongélation à -80°C pour au moins 24 h. Tel que mentionné précédemment, l'OCT devrait être évité lors d'une expérience d'imagerie MS par MALDI en raison de sa forte ionisation. Cependant, la découpe de chenilles sans encastrement dans un polymère s'est avérée impossible due au fait qu'ils sont des animaux à corps mous ayant plusieurs cavités internes remplies d'air, rendant l'échantillon très fragile. La figure 13 présente les étapes nécessaires à l'encastrement des chenilles dans l'OCT via l'utilisation d'un moule de papier d'aluminium.

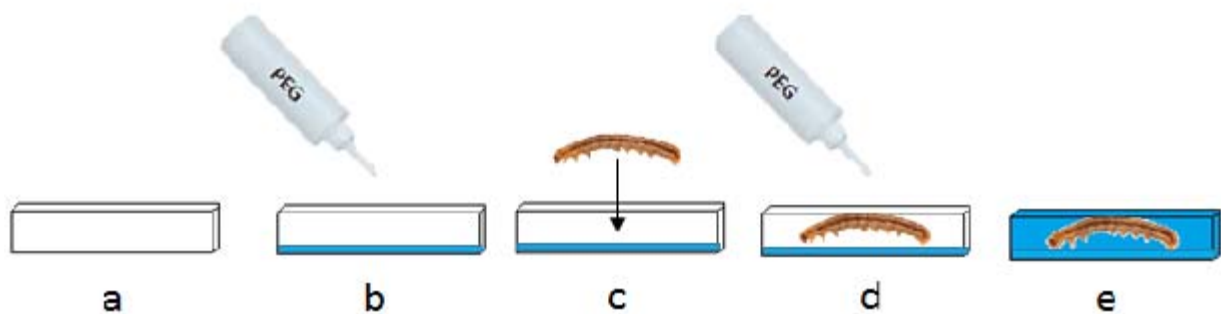


Figure 13. Préparation d'une chenille en vue de sa découpe en sections tissulaires minces à l'aide d'un cryostat. A) Fabrication d'un moule en papier d'aluminium. B) Dépôt d'une couche de polymère au fond du moule. C) Une fois la couche de polymère refroidie, l'insecte peut y être déposé. D-E) L'insecte est rapidement recouvert d'une autre couche de polymère et le bloc est déposé dans un congélateur à -80°C .

Une fois le temps d'attente minimal de 24 h dépassé, l'excédent d'OCT est éliminé à l'aide d'une lame de rasoir, puis l'échantillon peut être découpé en sections minces de $12\mu\text{m}$, sur la longueur de la chenille. Les sections sont ensuite déposées sur une lame ITO, préalablement refroidie dans le cryostat, puis fondues sur cette-ci en y glissant dessous un bloc d'aluminium maintenu à température pièce.

2.3 Préparation des diverses sections destinées à l'imagerie de protéines

2.3.1 Lavage des sections

Pour chacune des étapes d'optimisation en vue de l'imagerie de protéines, une section de chenille (3^{ième} stade larvaire) et une section de l'homogénat de foie de souris étaient montées en parallèle sur une même lame ITO. De cette façon, le modèle et l'échantillon d'intérêt sont exposés à la même préparation d'échantillon, permettant donc une comparaison juste. Avant l'étape de lavage, les sections ont d'abord été séchées dans un dessiccateur pendant 10 min. Le lavage préalable des sections est primordial afin d'obtenir une bonne sensibilité et une grande

qualité d'imagerie pour l'analyse des protéines. Les différentes procédures de lavages suivantes ont été testées :

1. Aucun lavage (contrôle)
2. EtOH 70%, EtOH 95%
3. *i*-PrOH 70%, *i*-PrOH 95%
4. EtOH 70%, EtOH 95%, 500mM ammonium formate dans H₂O:ACN (9:1; v/v, 0.1% acide trifluoroacétique, 0.1% Triton) suivi d'une immersion rapide dans H₂O (5 sec)
5. EtOH 70%, EtOH 100%, Carnoy's solution (EtOH:CHCl₃:CH₃COOH; v/v 6:3:1), EtOH 100%, H₂O, EtOH 100%

Le temps d'immersion pour les différentes étapes de ces lavages était de 30 s, sauf pour les solutions de Carnoy's et de formate d'ammonium, qui était respectivement de 2 min et 1 min 30 sec chaque. Les lames étaient ensuite séchées dans un dessiccateur pendant 20 min avant de procéder à la déposition de matrice.

2.3.2. Déposition de matrice et recristallisation pour l'imagerie MS des protéines

La sublimation de l'acide sinapinique (SA) sur les différentes sections en vue de l'imagerie MS des protéines se faisait en utilisant environ 300mg de matrice dans le fond du condensateur. La température du bain d'huile était réglée à 185°C, avec une pression dans le condensateur atteignant environ les 100mbar. Avec ces conditions, il était possible de sublimer la matrice sur deux lames à la fois, et ce, en environ 25 min. En prenant la masse de la lame avant et après la déposition de matrice, il était possible de calculer la densité de surface de SA déposée. La densité de surface de SA déposée moyenne était de 0,29±0,05mg/cm² (n=10). Une fois la matrice sublimée sur les sections, une étape de recristallisation est nécessaire afin d'extraire les analytes d'intérêts et de permettre la co-cristallisation. Une chambre de recristallisation dans un verre de

pétri (100 mm de diamètre × 20 mm de profondeur, VWR, 10754-790) a été montée selon la figure 14 suivante.

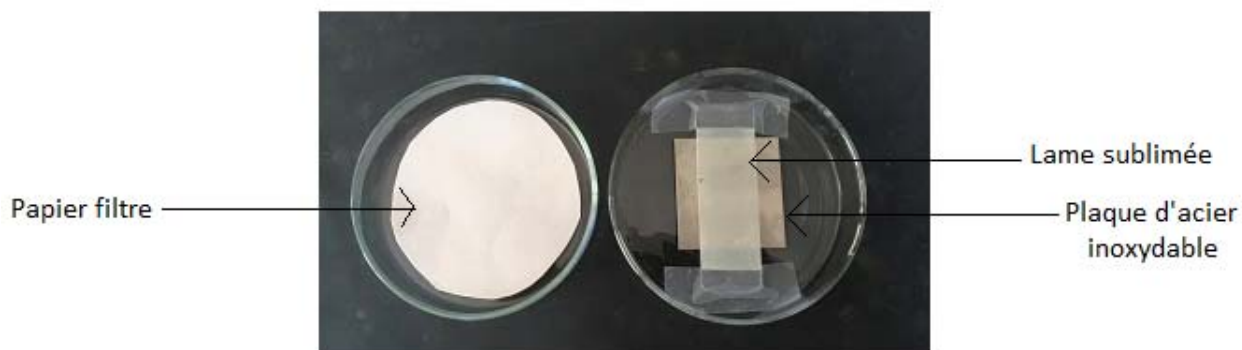


Figure 14. Montage utilisé comme chambre de recristallisation.

La lame est préalablement fixée à l'intérieur du couvercle sur une plaque d'acier inoxydable. Un mL de la solution de recristallisation était déposé sur un papier filtre dans le fond de la boîte de pétri. Une fois scellée, celle-ci était déposée dans un four préchauffé à 85°C pour un temps défini permettant aux vapeurs de pénétrer la matrice. Différentes solutions de recristallisation ont été testées :

1. H₂O (contrôle)
2. 5% CH₃COOH
3. 10% CH₃COOH
4. 1 % TFA
5. 5% ACN

En plus du solvant, différents temps de recristallisation ont été testés entre 1 min 30 sec et 3 min 30 sec. Une fois le temps de recristallisation écoulé, la chambre peut être sortie de four et ouverte pour permettre à la lame de sécher à l'air libre. La lame est ensuite entreposée dans un dessiccateur pour 10 min supplémentaires avant de procéder aux analyses par MALDI MS.

2.4 Préparation des sections destinées à l'imagerie MS des lipides

Trois sections sérielles de chenilles (4^{ième} stade) ont été soumises à une déposition de matrice par sublimation, mais avec 3 matrices différentes, soit le 1,5-diaminonaphtlène (DAN), le 2-mercaptobenzothiole (2-MBT) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB). Une fois coupées à 12µm, celles-ci étaient montées sur les lames d'ITO, puis séchées au dessiccateur pour 20 min en amont de la déposition de matrice. La sublimation des différentes matrices sur les sections s'est faite en utilisant également 300mg de matrice déposée au fond du condensateur. La température du bain d'huile était réglée à 165°C, avec une pression atteignant environ les 100mbar. Avec de telles conditions expérimentales, il était possible de sublimer le DAN en un peu moins de 8 min, le DHB en 10 min et le 2-MBT en 12 min. La densité de matrice déposée par unité de surface sur les lames était de 0,15 mg/cm² pour le DAN, 0,22 mg/cm² pour le DHB et 0,18 mg/cm² pour le 2-MBT. Ensuite, deux sections sérielles de chenilles (4^{ième} stade) ont été analysées après sublimation de DAN. L'une a servi pour l'imagerie en ionisation positive et négative des lipides, tandis que l'autre a servi à l'identification de ceux-ci par MALDI MS/MS. La densité de matrice (DAN) déposée par unité de surface sur les deux lames simultanément était de 0,13 mg/cm².

2.5 Spectrométrie de masse par MALDI

L'instrument utilisé pour le profilage et l'imagerie MS des protéines et lipides est un MALDI TOF/TOF Ultraflexxtreme équipé d'un laser SmartBeam II Nd:YAG/355nm opérant à 1000Hz (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Le logiciel utilisé permettant de contrôler l'instrument était flexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

Le profilage et l'imagerie MS des protéines s'est fait en mode linéaire, sur une gamme de masse entre 3 et 25kDa. Un potentiel d'accélération de +25kV était utilisé, et tous les autres paramètres instrumentaux (tension sur la lentille, voltage source 2, gain au détecteur, extraction retardée, énergie laser, etc.) ont été optimisés sur le modèle de foie homogène ainsi que sur la chenille afin d'obtenir le meilleur signal sur bruit (S/N) dans la gamme de masse considérée. Pour les analyses de profilages des polypeptides sur l'homogénat de foie, une accumulation de 250

tirs laser a été additionnée deux fois (500 tirs totaux). Pour les analyses de profilage des polypeptides des chenilles, une accumulation de 250 tirs laser a été analysée. Une image complète d'une chenille du 4^{ième} stade larvaire a été acquise avec les mêmes paramètres instrumentaux et une résolution spatiale de 50µm. Les conditions de préparation d'échantillon optimisées ont été utilisées pour cette image, soient un lavage avec la solution Carnoy's et une recristallisation de 3 min 30 sec au four à 85°C avec une solution d'acide acétique 5%. L'étalonnage préalable sur cette gamme de masse s'est fait de manière externe, avec un mélange standard de protéines.

L'imagerie MS des lipides en polarité positive et négative s'est faite en mode réflectron, sur une gamme de masse entre 500 et 1200Da. Un voltage d'accélération de +25kV était utilisé en polarité positive, tandis qu'un voltage d'accélération de -20kV était utilisé en polarité négative. Tous les autres paramètres instrumentaux ont été optimisés afin d'obtenir le meilleur S/N sur la gamme de masse considérée pour chacune des matrices. Les données d'imagerie MS ont été enregistrées via l'accumulation de 100 tirs laser par pixel, avec une résolution spatiale de 50µm. La caractérisation des lipides s'est faite via la comparaison des masses mesurées avec l'outil en ligne LIPID MAPS (http://www.lipidmaps.org/tools/ms/LMSD_search_mass_options.php)¹¹¹, et la confirmation s'est faite par MS/MS en mode LIFT-TOF/TOF.

Le traitement des données de profilages et d'imagerie MS a été fait à l'aide des logiciels FlexAnalysis 3.4 et FlexImaging 4.0. Le nombre de polypeptides par profiles étaient déterminé via l'utilisation des paramètres prédéfinis dans FlexAnalysis 3.4 (annexe 1).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Encastrement dans l'OCT et découpe en section minces de la chenille

L'un des premiers défis des travaux de recherches présentés dans ce mémoire passait par la découpe en sections minces d'échantillon de chenille, qui s'est avéré être assez complexe en raison de la grande fragilité des échantillons. Plusieurs tentatives de découpe des chenilles sans encastrement ont été infructueuses. L'OCT comme polymère d'encastrement de tissus présente plusieurs avantages, soit une conservation à plus long terme des tissus congelés, une plus grande facilité quant à la découpe de tissus très petits ou fragiles et permet également l'orientation anatomique spécifique des sections.¹¹² Cependant, tel que mentionné précédemment, l'OCT qui est un polymère organique, est détecté par MALDI et sa présence peut causer une suppression des autres signaux.

Deux méthodes d'encastrement n'utilisant pas l'OCT ont été testées. *Sosnowski et al.* ont testé l'encastrement, via l'utilisation d'un jaune d'œuf, de glandes pituitaires de rats afin d'identifier et d'imager les peptides endogènes s'y trouvant.¹¹³ L'encastrement des chenilles dans du jaune d'œuf a été testé, cependant la reproductibilité des coupes à une épaisseur de 12 µm était très laborieuse. En utilisant une autre approche, *Brignole-Baudoin et al.* ont été en mesure d'imager la distribution, dans des yeux de lapins, du chlorure de benzalkonium, un composé communément utilisé comme préservatif dans les gouttes pour les yeux.¹¹⁴ Les yeux de lapins étaient encastres dans de la gomme de tragacanth, soit un mélange complexe de plusieurs polysaccharides. L'encastrement des chenilles selon cette procédure a également été testé, mais une fois de plus, la reproductibilité des coupes était un problème. En effet, il aurait été très laborieux de tenter une étude à long terme, où il y aurait eu nécessité d'avoir plusieurs sections sérielles d'un échantillon à des anatomies bien définies.

Enfin, l'encastrement dans l'OCT a permis de faire de belles coupes reproductibles du modèle de chenille, et ce, même à des épaisseurs de 10µm. Sachant que les préparations d'échantillons développées dans le présent mémoire portent sur l'imagerie des lipides et des protéines, il a été possible de minimiser les effets de l'encastrement de l'échantillon dans l'OCT

pour ce type d'analyse. En effet, l'un des problèmes liés à l'encastrement d'organes de souris, par exemple, est l'infiltration du polymère en bordure de l'organe. Dans ce cas, il est possible d'observer une contamination à l'OCT des parois extérieures des sections. Cependant, il est possible de penser que l'infiltration du polymère dans la chenille est peu probable, étant donné qu'elle possède une cuticule extérieure. Une fois la chenille encastree et congelée, il est possible d'enlever l'excédent d'OCT. Puis, un rinçage de la section avec une solution aqueuse d'éthanol aide à enlever les résidus d'OCT pouvant avoir été dispersés sur la section lors de la coupe.¹¹⁵ Ce rinçage fait partie de plusieurs procédures de lavages testées, en amont d'une analyse pour la détection des protéines. Avec de telles précautions sur un échantillon de chenille, il a donc été possible de minimiser les interférences dues à l'encastrement dans l'OCT pour l'analyse de lipides et de protéines.

3.2 Sublimation/recristallisation de SA pour l'imagerie MS de protéines dans une section de chenille

Tout le processus d'optimisation du protocole de sublimation/recristallisation a été fait en parallèle sur des sections homogénat de foie, ainsi que sur des sections de chenille. L'homogénat de foie est un tissu artificiel présentant une variabilité moléculaire minimale à travers un bloc complet. En effet, tel que mentionné précédemment, ce tissu étant homogène dans toutes les orientations, il est idéal pour le développement de méthode. Il permet donc d'avoir un meilleur contrôle sur les différentes étapes d'optimisation. L'épaisseur des sections utilisée n'a pas été testée davantage, puisqu'il avait déjà été déterminé que ce paramètre n'influçait pas réellement les spectres MS. En effet, une étude a démontré que des sections tissulaires de foie de poulet variant entre 4 et 16µm d'épaisseur donnait essentiellement des profils protéiques identiques.⁹⁶ Une épaisseur de 12µm a donc été sélectionnée pour la coupe des échantillons, puisqu'il était réellement plus facile de couper et manipuler les sections de chenilles à cette épaisseur.

3.2.1 Optimisation des lavages

Tel que mentionné précédemment, le lavage préalable des sections tissulaires a prouvé son utilité en permettant une meilleure détection de molécules spécifiques, en particulier des protéines. Différentes approches de lavage bien répertoriées dans la littérature ont été testées avant déposition manuelle d'une solution de 15 mg/mL de matrice (ACN :H₂O 0.1% TFA, v/v) sur l'homogénat de foie seulement. Cette expérience a été refaite sur des sections de chenille, mais les résultats n'étaient pas statistiquement concluant. Ceci est essentiellement dû à la grande variabilité moléculaire observée à travers chaque section et d'une section à l'autre dans la chenille. Les travaux d'optimisation de la procédure de rinçage ont donc initialement été entrepris en utilisant des sections en provenance du bloc de tissu artificiel de foie de souris (figure 15). Pour cette étude, il aurait été judicieux de pouvoir construire un bloc de tissu artificiel à partir d'un homogénat de chenille. Malheureusement, la quantité de chenille fournie était insuffisante.

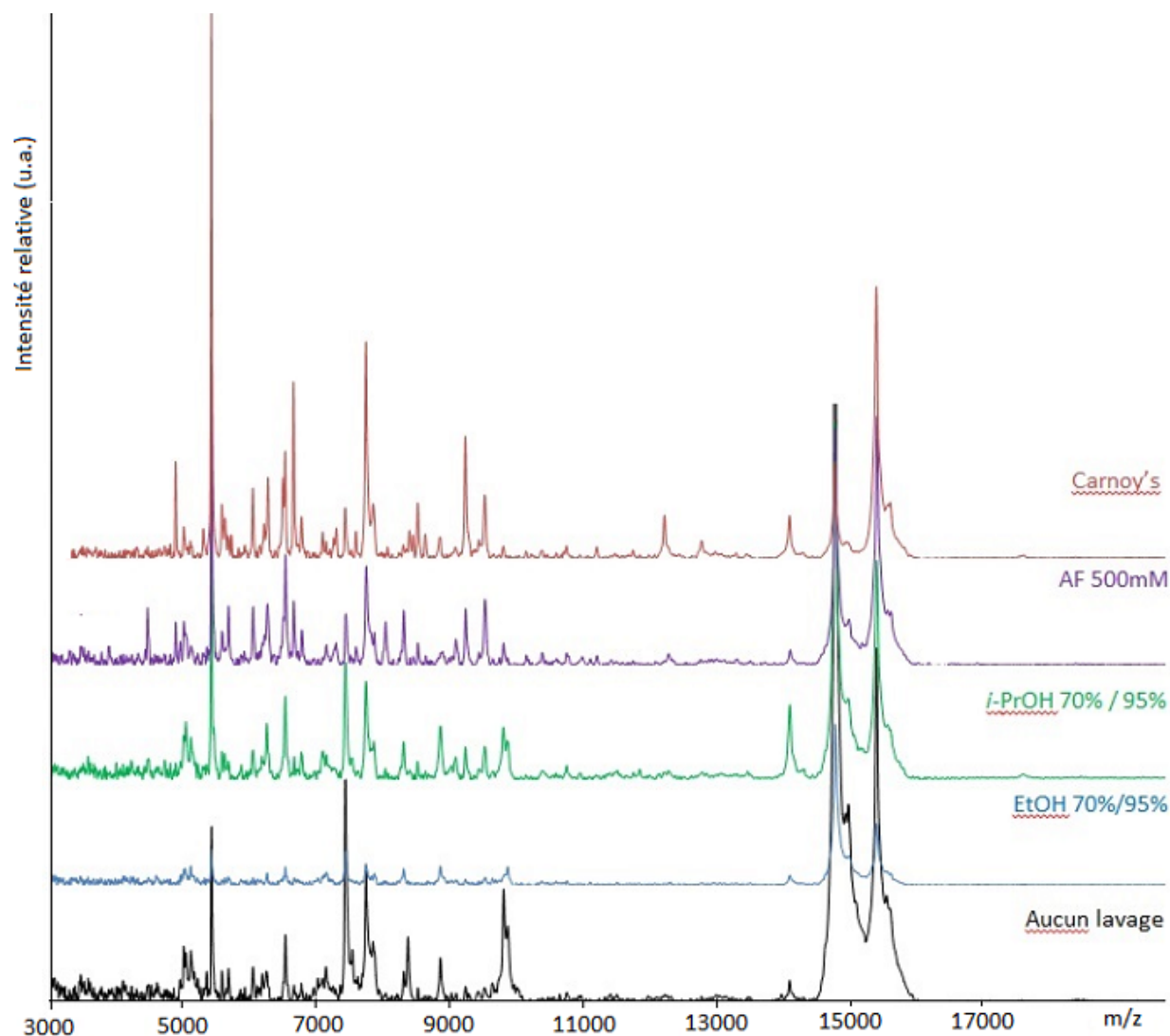


Figure 15. Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles de foie homogène (12 μ m) suite à différents protocoles de lavage suivant une déposition manuelle d'une solution de matrice de 15 mg/mL (ACN : H₂O 0.1%TFA, v/v).

Il est possible de remarquer à la figure 15, que deux lavages successifs à l'éthanol amènent une importante diminution de l'intensité des signaux de protéines dans le spectre lorsque comparé au contrôle. Pourtant, les lavages à l'éthanol sont décrits comme efficaces pour l'analyse de protéines sur tissus mammaliens dans la littérature.¹¹⁵⁻¹¹⁶ Le problème encouru avec des lavages à l'éthanol, qui explique probablement cette grande diminution de signal, est le fait

que l'homogénat de foie a tendance à se décoller de la surface de la lame d'ITO suite au lavage dans une solution aqueuse d'éthanol. Il était donc difficile d'obtenir un profil protéique réellement représentatif de la section. Ensuite, il est possible de voir que des lavages à l'isopropanol, au Carnoy's et au formate d'ammonium ont pour effet d'augmenter l'intensité et le nombre de signaux observés. De plus, ils permettent également de diminuer la très forte présence du signal des deux chaînes α et β de l'hémoglobine (m/z 14975 et m/z 15609) qui domine le spectre. En effet, le renforcement de l'ionisation des autres protéines permet donc de diminuer la suppression ionique causée par le fort signal de ces deux protéines lorsqu'aucun lavage n'est fait au préalable. Une fois établi que ces trois procédures apportaient réellement un gain pour la détection des protéines sur un homogénat de foie, ces lavages ont alors été testés en parallèle sur les deux types d'échantillons avant l'étape de sublimation/recristallisation de la matrice (SA).

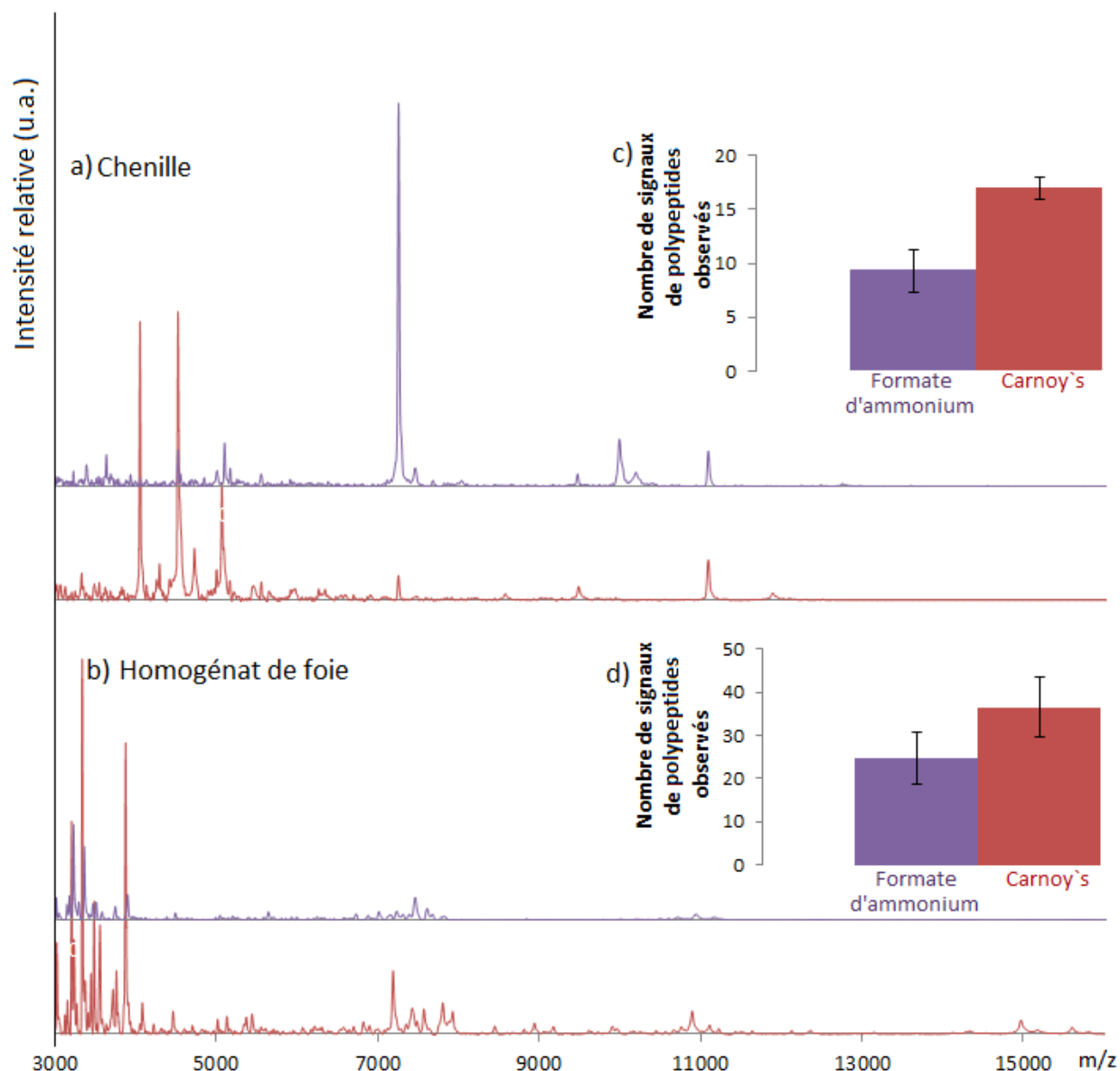


Figure 16. a-b) Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils protéiques de sections sérielles de chenille (12µm) et de foie de souris (12µm) suite à un lavage au formate d'ammonium (mauve, haut) et au Carnoy's (rouge, bas) en amont d'une sublimation/recrystallisation de la matrice (SA).c-d) Comparaison du nombre de polypeptides observés suivant ces paramètres pour la préparation des échantillons (n=3).

Aucun signal n'était détecté suite à un lavage à l'isopropanol, en amont d'une sublimation/recrystallisation de SA à partir des sections d'homogénat de foie et de chenille. En

effet, seulement les lavages au Carnoy's et au formate d'ammonium permettaient d'obtenir un profil polypeptidique des deux échantillons (figure 16). Le nombre de polypeptides observés est fonction des paramètres décrits pour l'algorithme de détection du logiciel FlexAnalysis présenté en Annexe 1. L'ensemble des spectres obtenus tout au long de l'étude ont été analysés avec ces mêmes paramètres expérimentaux. Le nombre de signaux observés donne un net avantage à la procédure de lavage au Carnoy's décrite par *Yang et al.* démontrant l'efficacité de la sublimation/recristallisation du SA pour l'imagerie de protéines.⁹⁶ L'écart-type sur le nombre de polypeptides observés (n=3) à la figure 16 ne permet cependant pas d'affirmer, hors de tout doute, qu'un lavage préalable au Carnoy's offre une meilleure reproductibilité en comparaison à un lavage au formate d'ammonium. Cependant, c'est cette procédure de lavage qui a été appliquée pour toutes les autres expériences d'optimisation du protocole de sublimation/recristallisation en raison du plus grand nombre de polypeptides détectés sur les deux types d'échantillons. Il est également intéressant de remarquer sur la figure 16, la grande dissemblance entre les profils protéiques de l'homogénat de foie et de la chenille. En effet, les protéines assurent une multitude de fonctions dans les cellules et les tissus biologiques, et les gènes les encodant sont clairement très différents entre la souris et la chenille.

Enfin, une autre observation intéressante est la différence notable entre les profils polypeptidiques observés sur l'homogénat de foie de souris présentés aux figures 15 et 16. Les spectres de la figure 15, obtenus suite à une déposition manuelle de matrice en solution, sont plus riches en polypeptides que ceux présentés à la figure 16. Les spectres de la figure 16 ont été obtenus via une déposition de matrice par sublimation, suivi d'une étape de recristallisation sous atmosphère saturée de CH₃COOH 5%. L'extraction des protéines intactes des tissus s'est donc faite de manière très différente. L'interface liquide manuellement déposée sur le tissu semble permettre une extraction plus efficace des polypeptides.

3.2.2. Optimisation du solvant de recristallisation

Le second paramètre ayant été optimisé pour cette préparation d'échantillon a été celui du solvant de recristallisation. Ce paramètre est important puisqu'il est celui qui dicte l'extraction des protéines pour leur éventuelle co-cristallisation avec la matrice déposée par sublimation. L'étude précédente montrait que pratiquement aucun signal n'est observé si ce solvant est majoritairement organique.⁹⁶ Le solvant ayant donné les meilleurs résultats, dans l'étude précédente, est celui à 5% d'acide acétique. Sachant que par MALDI les protéines s'ionisent préférentiellement en mode positif, c'est-à-dire en acceptant un proton, il y a donc pertinence d'incorporer un certain pourcentage acide dans le solvant de recristallisation. Les solvants choisis tenaient pour compte ces observations, et donc, différentes solutions à base aqueuses, légèrement acides, ont été sélectionnées. La figure 17 ne démontre aucune différence claire attribuable au solvant de recristallisation utilisé, tant au niveau du nombre de polypeptides détectés qu'à la reproductibilité de l'expérience. Cependant, en imagerie MALDI MS, l'important n'est pas seulement de détecter le plus grand nombre de molécules différentes, mais également s'assurer qu'aucune délocalisation des analytes n'est induite suite à la préparation d'échantillon.

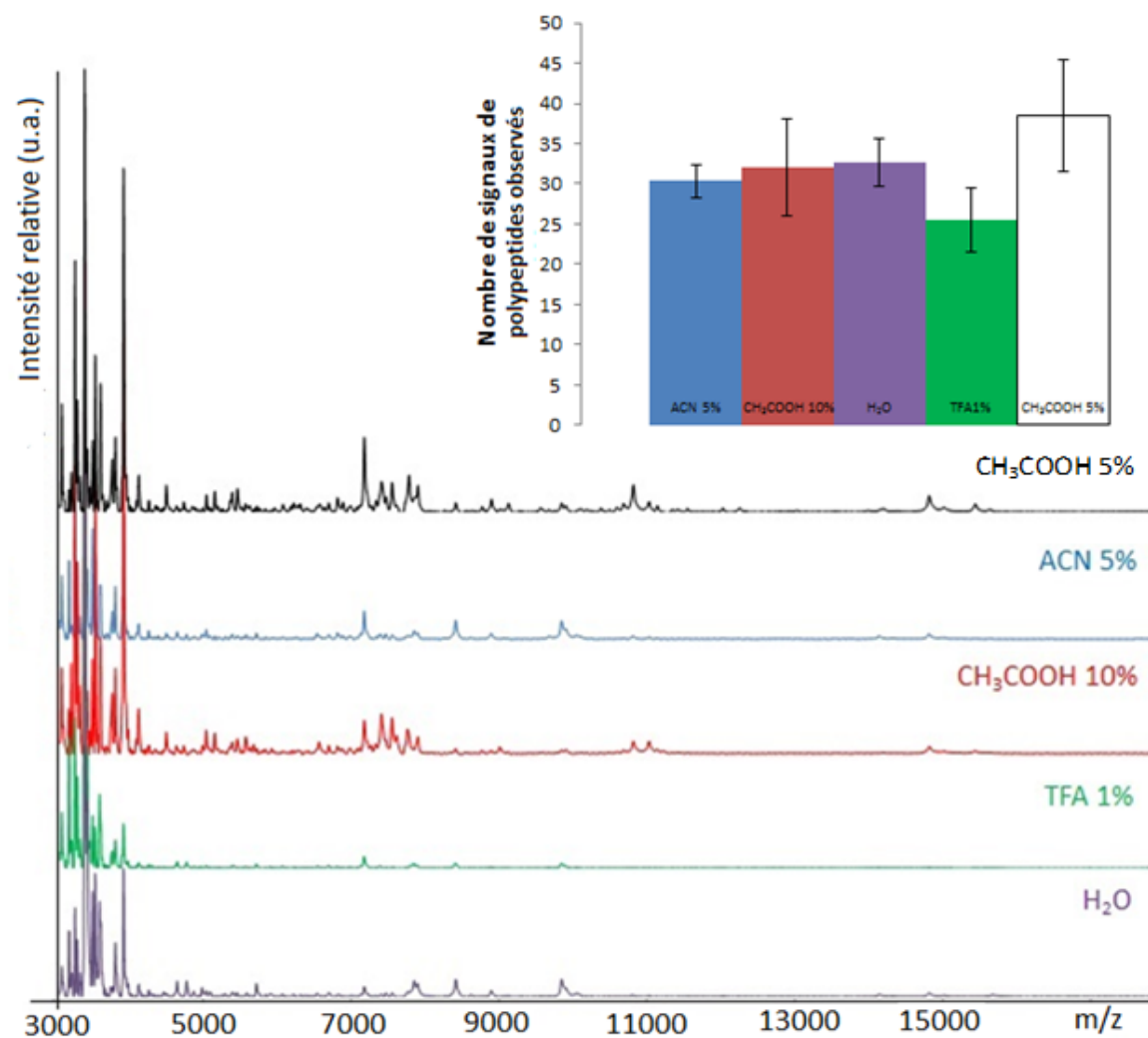


Figure 17.a) Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles d'homogénat de foie (12 μ m) après une recristallisation de 3 min de la matrice avec différentes solutions. b) Comparaison du nombre de polypeptides observés suivant ces paramètres pour la recristallisation (n=3).

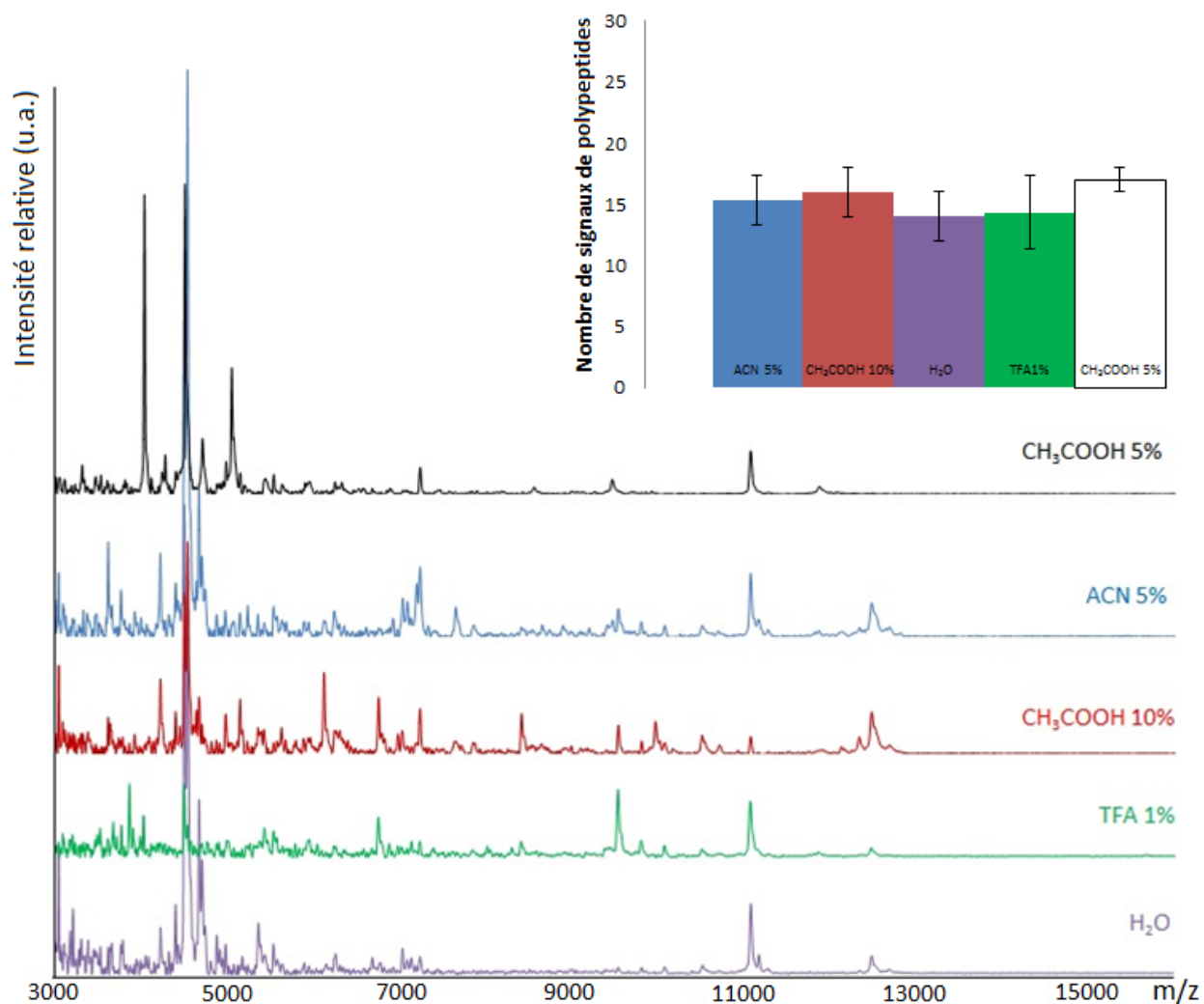


Figure 18.a) Spectres MALDI-TOF MS présentant les profils polypeptidiques de sections sérielles de chenille (12 μ m) après une recrystallisation de 3 min de la matrice avec différentes solutions. b) Comparaison du nombre de polypeptides observés suivant ces paramètres pour la recrystallisation (n=3).

Il est possible de voir que le solvant de choix pour la recrystallisation sur le modèle de chenille via cette méthode de préparation d'échantillon est aussi difficile à déterminer (figure 18). Les profils polypeptidiques (figure 18.a) choisis semblent montrer un certain avantage pour la recrystallisation avec ACN 5% et CH₃COOH 10%. Cependant, en regardant le diagramme, représentant le nombre moyen de protéines détectées par spectre, ce léger avantage semble

être perdu au profit d'une recristallisation avec CH_3COOH 5%. De plus, la variabilité dans le nombre de polypeptides détectés est plus petite suite à une recristallisation avec CH_3COOH 5%. Le diagramme est probablement plus représentatif, puisqu'il tient en compte d'une optimisation en triplicata, tandis que les spectres ne présentent qu'un des profils obtenus par solvant. De plus, malgré le fait de prendre une image de quelques pixels ciblés dans une région de la chenille, la grande variabilité moléculaire présente à travers l'échantillon peut amener des différences importantes quant au nombre de protéines détectées. En effet, il est possible que le spectre après recristallisation au CH_3COOH 10% ait été obtenu dans une région plus dense en polypeptides que celui du CH_3COOH 5%. Enfin, la recristallisation avec CH_3COOH 5% n'a démontré aucune délocalisation dans l'étude précédente, alors c'est cette solution qui a été choisie comme solvant de recristallisation pour le reste de l'étude.

3.2.3 Optimisation du temps de recristallisation

Le dernier paramètre étudié a été le temps de recristallisation de la matrice. Différents temps ont été testés. Il a été remarqué (figure 19) que plus le temps de recristallisation est long, plus le nombre de protéines observées dans les spectres augmente, ce qui était prévisible. À des temps de recristallisation sous les 1 min, aucun signal n'était observé, ni sur une section de chenille ni sur l'homogénat. À des temps supérieurs à 4 min, il a été observé un excès d'eau condensée sur la section pouvant induire une délocalisation des analytes. Sur la figure 19, il est possible de remarquer qu'après un temps de 3 min 30 sec au four, un maximum de protéines était extrait, déterminant donc cette condition comme celle de choix pour les analyses d'imagerie de la prochaine section.

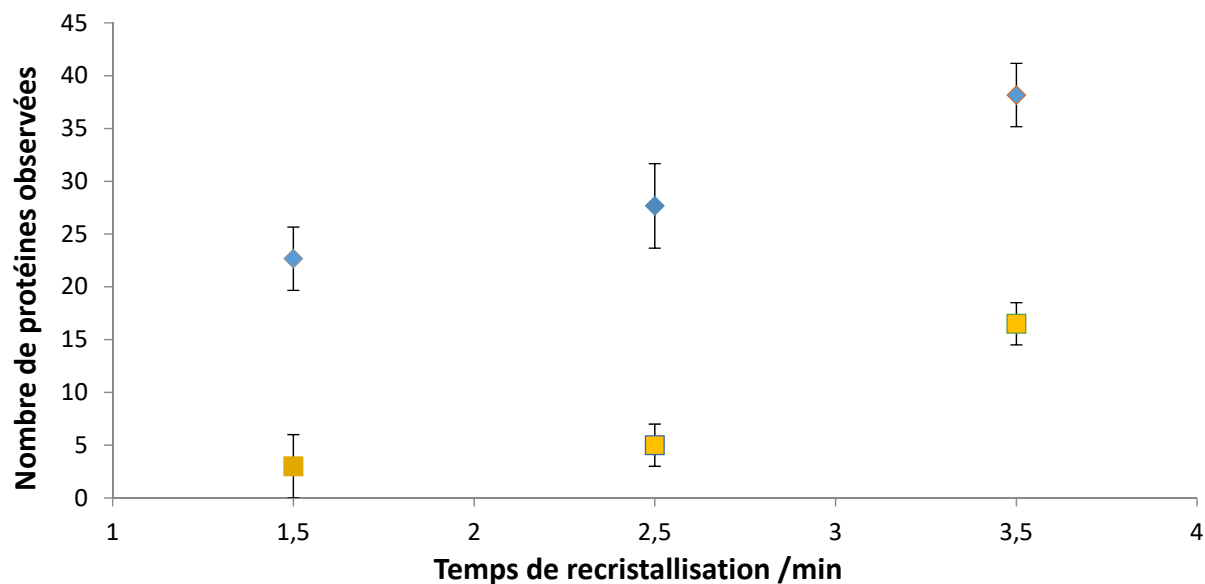


Figure 19. Nombre de protéines détectées en fonction du temps de recristallisation pour des sections d'homogénat de foie (losanges bleus, haut) et de chenille (carrés jaunes, bas).

Ces différentes expériences ont permis de mettre en lumière les problèmes liés à l'optimisation de cette procédure sur un échantillon de chenille notamment au niveau de la reproductibilité. En effet, plusieurs paramètres affectent la qualité et l'intensité des signaux obtenus. La densité de matrice déposée sur la section est un paramètre très important à contrôler pour permettre une bonne reproductibilité. Des études préalable ont permis de déterminer qu'une densité de matrice entre 0,12 et 0,27mg/cm² était optimale pour obtenir des profils protéiques essentiellement identiques sur des sections sérielles de foie de poulet.⁹⁶ La densité de matrice moyenne déposée pour les analyses effectuées dans la présente section était de 0,29±0,05mg/cm². La moyenne se situe donc un peu à l'extérieur de ce qui était recommandé, mais il était très difficile de contrôler cette déposition. En effet, d'une journée à l'autre, même si la température du bain d'huile, la pression dans le condensateur et le temps de sublimation étaient gardés constants, des différences au niveau de la quantité de matrice déposée était observées. L'intérêt d'obtenir un système automatisé de sublimation permettant de contrôler l'épaisseur de matrice est donc justifiable. De plus, une seule chenille a été utilisée pour toute l'optimisation. Des sections sur la presque totalité de l'échantillon ont été utilisées à ces fins,

expliquant donc la variabilité moléculaire observée sur les différents paramètres d'optimisation. Ce problème, qui était envisagé, justifie également pourquoi l'optimisation en parallèle sur le tissu artificiel d'homogénat de foie a été faite. Il est donc intéressant, lorsque possible, de pouvoir optimiser les préparations d'échantillon sur des tissus artificiels du modèle utilisé pour ainsi s'assurer que l'ensemble de tous les paramètres utilisés ne soient pas faussement choisis dû à la variabilité biologique de l'échantillon utilisé.

3.2.4. Imagerie de protéines d'une section de chenille du 4^{ième} stade larvaire

Une fois les différents paramètres de la sublimation/recristallisation optimisés, une image présentant la distribution de protéines à travers la chenille a pu être acquise. Il est possible d'observer à la figure 20, la grande régiospécificité de certains de ces signaux. Par exemple, m/z 6401 est très localisé dans la tête de la chenille, tandis que m/z 6757 est plutôt distribué à travers toute la section tissulaire. Il est également possible d'observer une excellente corrélation entre la distribution de ces différentes protéines et la section colorée, qui peut servir de référence pour identifier les histologies présentes. De plus, cette corrélation démontre que la délocalisation des analytes est non-existante ou très minime, c'est-à-dire, au moins inférieure à la résolution spatiale utilisée pour l'imagerie ($<50\mu\text{m}$). Il est également intéressant de noter qu'aucune protéine n'est détectée dans la cavité interne du tube digestif du modèle, et qu'aucune coloration n'est présente également. Enfin, il est à noter que certains signaux présentés à la figure 20 ne sont pas observés dans les profils polypeptidiques présentés ci-haut (figure 18). Ceci est normal car les signaux, tels que m/z 7397 et m/z 9995 sont très localisés dans la chenille, et les profils peptidiques obtenus n'ont probablement pas été accumulés dans la même région. Ceci renforce donc l'utilité d'avoir un tissu modèle homogène pour la préparation de tout nouvel échantillon dédié à l'imagerie par MALDI MS.

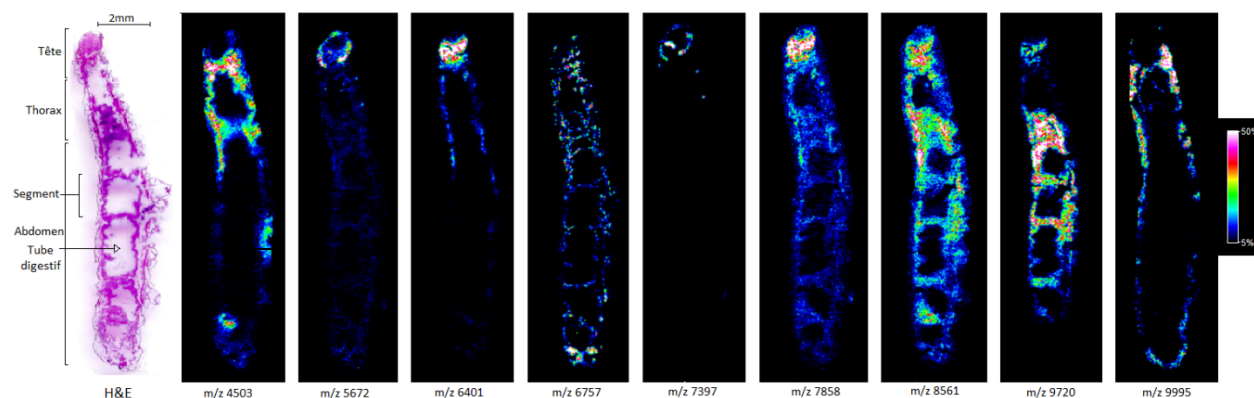


Figure 20. MALDI IMS une section tissulaire mince de chenille de 12µm après sublimation/re cristallisation de la matrice (SA) et acquisition avec une résolution spatiale de 50µm. Les images présentent la distribution de signaux de protéines sur toute la longueur de chenille en corrélation avec l’histologie (H&E).

3.3 L’imagerie MS de lipides dans une section de chenille

Les lipides constituent une large proportion des molécules organiques contenues dans une cellule et présentent une diversité importante quant à leur structure chimique et leur fonction biologique.¹¹⁷ Une attention considérable a été portée sur la préparation d’échantillon afin d’imager différents lipides sur des sections tissulaires par MALDI. En effet, plusieurs méthodes de déposition de matrice ont été testées au fil des années. La sublimation de la matrice s’est avérée être la méthode la plus efficace, et ce pour plusieurs raisons. D’abord, aucun solvant n’est utilisé minimisant donc au maximum les possibilités de délocalisation des analytes.¹¹⁸ En effet, les lipides étant très abondants sur la surface même de la section tissulaire, aucune interface liquide permettant d’extraire les analytes d’intérêts n’est donc nécessaire. De plus, la taille des cristaux déposés sur l’échantillon est très petite (<1µm), offrant donc des possibilités d’imagerie à plus haute résolution spatiale. Enfin, la déposition de matrice via sublimation permet un dépôt très homogène sur la surface, offrant donc des images de qualité. La première publication démontrant la possibilité de l’imagerie MALDI des lipides suivant une sublimation a été décrite en 2008, en utilisant le DHB comme matrice.¹¹⁸ Différentes matrices ont par la suite été testées,

et il a été observé que le DAN était la matrice la plus efficace pour la détection de lipides, dans les deux polarités de détection, sur des sections tissulaires minces de souris.³⁴ Le DHB permet également la détection des lipides dans les deux polarités, mais son rendement en mode négatif est beaucoup moins efficace qu'avec le DAN. Le même constat a pu être observé avec l'utilisation du 2-MBT comme matrice.³⁴

Des méthodes de préparation d'échantillon par sublimation de différentes matrices à des fins d'imagerie de différentes classes de phospholipides ont donc été testées sur des sections tissulaires minces du modèle de chenille. Le but de ces expériences était de vérifier si les conditions de préparation d'un tel type d'échantillon non mammalien permettent l'obtention d'images ioniques de qualités comparables à celles obtenues pour des tissus mammaliens. De plus, l'efficacité du DAN comme matrice pour la détection de lipides, dans les deux polarités, sur des échantillons de chenilles a été comparé à deux autres matrices, soit le DHB et le 2-MBT.

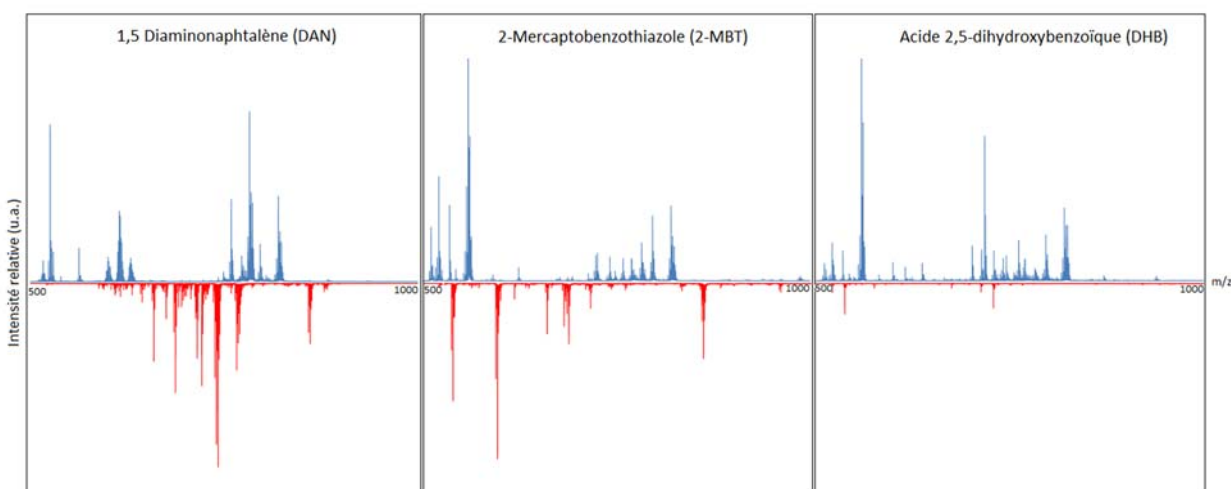


Figure 21. Comparaison des signaux lipidiques obtenus, entre m/z 500 et 1000, sur une section de chenille suivant la sublimation de trois matrices, soit le DAN, le 2-MBT et le DHB. Les spectres en bleu (haut) et ceux en rouge (bas) représentent respectivement les modes d'ionisation positif et négatif.

La figure 21 démontre l'efficacité du DAN comme matrice lors de l'analyse par MALDI des lipides dans les deux polarités. Il est également possible d'observer la grande efficacité du 2-MBT

et du DHB pour la détection des lipides en mode positif. En effet, il est possible de voir que l'intensité des signaux en mode positif pour ces deux matrices est comparable à celle obtenue avec le DAN. De plus, certains signaux positifs sont exclusifs à l'utilisation du 2-MBT et du DHB, principalement entre m/z 600 et 700. L'on observe en effet que cette zone de signal en mode positif est très limitée avec l'utilisation du DAN. Ceci s'explique principalement par les ions de matrice détectés dans cette région lors d'une sublimation avec le DAN. Cependant, il est possible d'observer la domination du DAN comme matrice pour la détection de lipides en mode négatif. La possibilité de détection efficace dans les deux polarités qu'offre le DAN reste cruciale. Dans une seule expérience, une importante quantité d'informations sur les lipides peut être obtenue en utilisant le DAN comme matrice, puisqu'il est possible d'imager en mode positif et en mode négatif sur une seule et unique section tissulaire mince de chenille.³⁴ Cependant, il a été possible d'observer que l'utilisation d'autres matrices offrent des signaux exclusifs, principalement en mode positif. Il est intéressant de pouvoir obtenir une évaluation rapide des lipides présents à travers une section tissulaire de chenille en utilisant le DAN. Cependant, si un lipide ou une classe de lipide particulière se veut être un sujet d'imagerie, il devient alors important de tester différentes matrices pour obtenir les meilleurs résultats. Au vu des résultats obtenus, à savoir la qualité des signaux MS et des images ioniques, il est néanmoins possible de conclure que la méthode de préparation actuelle des échantillons par sublimation de matrices pour l'analyse par IMS de lipides sur sections tissulaires minces de chenilles est acceptable, et les résultats sont comparables à ceux pouvant être obtenus sur échantillon mammalien.

Une image montrant la distribution de différentes classes de lipides a été enregistré en utilisant le DAN comme matrice. Les signaux détectés et présentés à la figure 22 ont été analysés par MS/MS afin d'identifier la classe de phospholipides à laquelle ils appartiennent. Il est possible d'observer, à l'annexe 2, les patrons de fragmentation attribuant les différents lipides détectés à leur classe respective. Il a été possible d'identifier des lipides appartenant à quatre classes distinctes, soit des acides phosphatidiques (PA), des phosphatidylinositols (PI), des phosphatidylethanolamines (PE) et des phosphatidylcholines (PC) à partir de sections tissulaires de chenille. Après dépôt de la matrice par sublimation et imagerie MS en ionisation positive et négative avec une résolution spatiale de 50 μ m, on peut remarquer à la figure 22 que la

distribution des différents signaux de phospholipides observés est moins régionalisée que celle des protéines. Seul le signal observé à m/z 794.6 correspondant au PC(38:3) présente une régiospécificité marquée puisqu'il n'est localisé que dans la tête de la chenille. Il est également possible de constater que la régiospécificité des signaux n'est pas attribuable à une classe spécifique de phospholipides. En effet, le PA(35:1) à m/z 687.5 est localisé dans les parois externes de la chenille, tandis que le PA(36:4) à m/z 695.4 semble être plutôt localisé sur les parois internes. Enfin, il est intéressant de noter que seulement quatre classes de phospholipides, soit les PA, PI, PE et PC, ont pu être observées sur les sections tissulaires de chenilles. Habituellement, dans les tissus mammaliens, d'autres classes de phospholipides sont aussi détectées suite à une sublimation de DAN, telles que les phosphatidylglycérol (PG) et des phosphatidylsérine (PS).³⁴

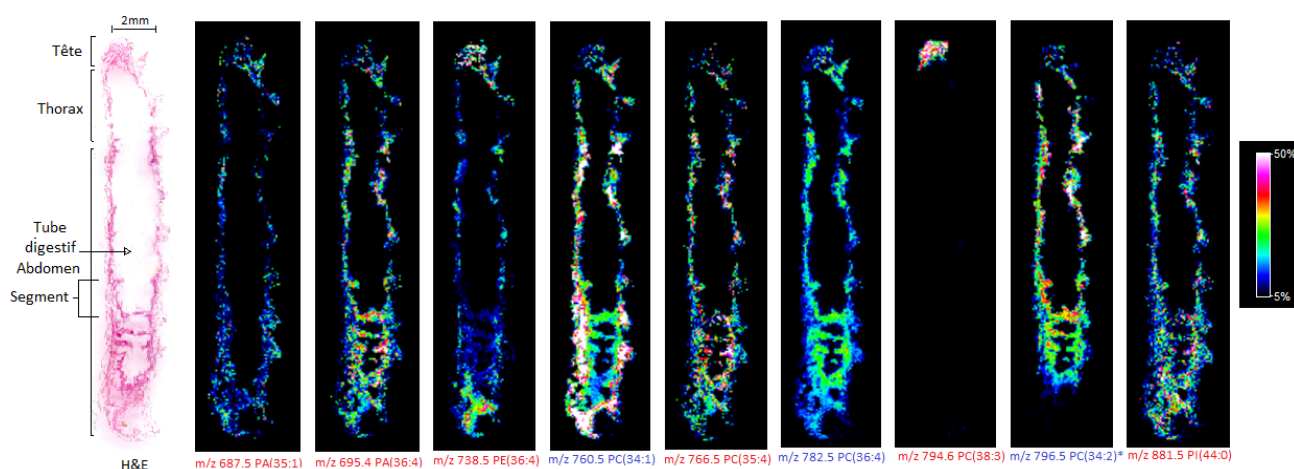


Figure 22. MALDI IMS une section tissulaire mince de chenille de 12 μ m après sublimation de la matrice (DAN) et acquisition avec une résolution spatiale de 50 μ m. Les images présentent la distribution de signaux de lipides sur toute la longueur de chenille en corrélation avec l'histologie (H&E). Les signaux en rouges représentent des espèces observées en ionisation négative, tandis que les signaux en bleus représentent d'autres espèces observées en ionisation positive. * indique un adduit potassium ([M+K]⁺).

CONCLUSION :

En conclusion, étant conscient que l'optimisation de tous les paramètres expérimentaux pour chaque type d'échantillon est nécessaire, l'imagerie MS est une technique qui peut être utilisée dans plusieurs domaines de recherches. Différentes méthodes de préparation d'échantillons ont été testées afin d'imager des lipides et des protéines à travers une section tissulaire mince d'une chenille.

Ces travaux de recherches ont d'abord permis d'optimiser un protocole permettant l'encastrement et la découpe efficace d'un tissu fragile, soit une chenille, en sections tissulaires de 12µm. Ensuite, un protocole de sublimation/recristallisation permettant l'imagerie de protéines a été optimisé. Cette méthode passe par une déposition initiale à sec de la matrice, puis une réhydratation permettant l'extraction de ces molécules est effectuée. Les résultats obtenus et la qualité des signaux MS permettent de conclure que le protocole est optimisé et permet la détection efficace d'un bon nombre de protéines. De plus, il est également possible de conclure que les conditions optimisées de préparation d'échantillon suivant ce protocole sont très semblables, et ce, que l'échantillon soit une chenille ou un tissu mammalien.

Les résultats obtenus dans les différentes étapes de ce protocole démontrent cependant un certain manque de reproductibilité. Deux solutions pourraient pallier à ce problème. D'abord, il serait pertinent d'avoir un tissu artificiel pour chaque échantillon d'intérêt. Il serait ainsi possible d'optimiser les différents paramètres expérimentaux en ayant une plus faible variabilité moléculaire d'une section tissulaire à l'autre. De plus, l'utilisation d'un système automatisé pour la sublimation de matrice amènerait un meilleur contrôle de l'épaisseur de matrice déposée à chaque expérience, permettant donc une meilleure reproductibilité des signaux observés.

Ensuite, ces travaux de recherches ont également permis d'imager la distribution de différentes classes de phospholipides à travers une section de chenille, via une sublimation de la matrice. D'abord, la qualité, l'intensité et l'abondance de signaux de lipides dans les chenilles ont été comparés suivant la sublimation de trois matrices différentes, soit le DAN, le DHB et le 2-MBT. Ces trois matrices ont été sélectionnées en raison de la possibilité qu'elles offrent pour l'analyse dans les deux polarités en MALDI. Le DAN offrait des performances sensiblement égales

aux deux autres matrices en mode positif, mais il dominait en mode négatif, ce qui avait préalablement été observé sur des tissus mammalien.³⁴ Enfin, il a été possible d'imager la distribution de quatre classes de phospholipides à travers une section tissulaire mince de chenille, et ce, en mode positif et négatif.

3.1 Perspectives de recherche

Les travaux de recherches effectués ont permis d'optimiser des méthodes de préparation d'échantillon destinés à l'imagerie MS de différentes biomolécules dans un modèle non mammalien, soit la chenille. Les futurs travaux porteront d'abord sur l'optimisation d'une méthode de préparation d'échantillon permettant la détection et l'analyse de peptides endogènes présents dans le modèle de chenille. Ensuite, il sera possible de caractériser diverses interactions de la chenille avec son environnement, via l'étude de la réponse moléculaire de l'organisme par imagerie MS. Par exemple, l'une des idées d'étude proposée est de regarder la réponse métabolique de l'organisme suite à un jeûne de 24 h précédant l'analyse. Plusieurs stimuli de ce type, ainsi que la réponse métabolique observée, pourraient être étudiés. En effet, il sera intéressant de pouvoir mieux comprendre leurs différents mécanismes biologiques, en vue de trouver une façon de limiter les dégâts de cette famille de chenilles sur les plantations, tout en minimisant les effets négatifs des insecticides chimiques utilisés.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Griffiths, I. W., J. J. Thomson - The centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11* (1), 2-16.
2. Muenzenberg, G., Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *349*, 9-18.
3. Sharma, K. S., Mass spectrometry-The early years. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *349*, 3-8.
4. Jonsson, G. P.; Hedin, A. B.; Hakansson, P. L.; Sundqvist, B. U.; Saeve, B. G. S.; Nielsen, P. F.; Roepstorff, P.; Johansson, K. E.; Kamensky, I.; Lindberg, M. S., Plasma desorption mass spectrometry of peptides and proteins adsorbed on nitrocellulose. *Analytical Chemistry* **1986**, *58* (6), 1084-1087.
5. Dell, A., FAB-mass spectrometry of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **1987**, *45*, 19-72.
6. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **1985**, *57* (3), 675-679.
7. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2* (8), 151-153.
8. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299-2301.
9. Gross, J. H.; Roepstorff, P., *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Berlin Heidelberg: 2011, p.76; 112.
10. Menet, M.-C., Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, *2011* (437), 41-53.
11. Dass, C., *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Wiley: 2007, p.7.
12. Thibault, P., CHM2102-Chimie analytique 2. Université de Montréal, 2004.
13. Todd, J. F. J., Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *142* (3), 209-240.
14. Fenner, N.; Daly, N., Laser used for mass analysis. *Review of Scientific Instruments* **1966**, *37* (8), 1068-1070.
15. Vastola, F. J.; Mumma, R. O.; Pirone, A. J., Analysis of organic salts by laser ionization. *Organic Mass Spectrometry* **1970**, *3* (1), 101.
16. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
17. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.
18. Puretzky, A. A.; Geohegan, D. B.; Hurst, G. B.; Buchanan, M. V.; Luk'yanchuk, B. S., Imaging of vapor plumes produced by matrix assisted laser desorption: A plume sharpening effect. *Physical Review Letters* **1999**, *83* (2), 444-447.

19. Dreisewerd, K., The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews* **2003**, 103 (2), 395-426.
20. Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J., *MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications*. John Wiley & Sons: 2013.
21. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* **1992**, 27 (4), 472-480.
22. Knochenmuss, R., A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation. *Analytical Chemistry* **2003**, 75 (10), 2199-2207.
23. Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J., Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35 (1), 1-12.
24. Krüger, R.; Pfenninger, A.; Fournier, I.; Glückmann, M.; Karas, M., Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (24), 5812-5821.
25. Beavis, R. C.; Chait, B. T.; Fales, H., Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3 (12), 432-435.
26. Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T., α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* **1992**, 27 (2), 156-158.
27. Lidgard, R.; Duncan, M. W., Utility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9 (2), 128-132.
28. Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F., 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, 111, 89-102.
29. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* **1991**, 63 (24), 1193A-1203A.
30. Xu, N.; Huang, Z.-H.; Watson, J. T.; Gage, D. A., Mercaptobenzothiazoles: A new class of matrices for laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, 8 (2), 116-124.
31. Wu, K. J.; Steding, A.; Becker, C. H., Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7 (2), 142-146.
32. Debois, D.; Bertrand, V.; Quinton, L.; De Pauw-Gillet, M.-C.; De Pauw, E., MALDI-in source decay applied to mass spectrometry imaging: a new tool for protein identification. *Analytical Chemistry* **2010**, 82 (10), 4036-4045.
33. Korte, A. R.; Lee, Y. J., MALDI-MS analysis and imaging of small molecule metabolites with 1,5-diaminonaphthalene (DAN). *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, 49 (8), 737-741.
34. Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P., Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information

in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (4), 2048-2054.

35. Pitt, J. J.; Gorman, J. J., Matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of sialylated glycopeptides and proteins using 2,6-dihydroxyacetophenone as a matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10* (14), 1786-1788.

36. Gorman, J. J.; Ferguson, B. L.; Nguyen, T. B., Use of 2,6-Dihydroxyacetophenone for Analysis of Fragile Peptides, Disulphide Bonding and Small Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10* (5), 529-536.

37. Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *141* (2), 127-148.

38. Ens, W.; Mao, Y.; Mayer, F.; Standing, K., Properties of matrix-assisted laser desorption. measurements with a time-to-digital converter. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5* (3), 117-123.

39. Medina, N.; Huth-Fehre, T.; Westman, A.; Sundqvist, B. U. R., Matrix-assisted laser desorption: Dependence of the threshold fluence on analyte concentration. *Organic Mass Spectrometry* **1994**, *29* (4), 207-209.

40. Stephens, W., A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Review of Scientific Instruments* **1953**, *24* (8), 616-617.

41. Wiley, W.; McLaren, I. H., Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26* (12), 1150-1157.

42. Ryhage, R., Use of a mass spectrometer as a detector and analyzer for effluent emerging from high temperature gas liquid chromatography columns. *Analytical Chemistry* **1964**, *36* (4), 759-764.

43. Gohlke, R. S., Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Analytical Chemistry* **1959**, *31* (4), 535-541.

44. Watson, J. T.; Biemann, K., Direct recording of high resolution mass spectra of gas chromatographic effluents. *Analytical Chemistry* **1965**, *37* (7), 844-851.

45. Cotter, R. J., The new time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (13), 445A-451A.

46. Bökelmann, V.; Spengler, B.; Kaufmann, R., Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization. *European Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *1* (1), 81-93.

47. Glückmann, M.; Karas, M., The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34* (5), 467-477.

48. Alikhanov, S., A new impulse technique for ion mass measurements. *Soviet Phys. Journal of Experimental and Theoretical Physics* **1957**, *4*.

49. Mamyurin, B.; Karataev, V.; Shmikk, D.; Zagulin, V., The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Journal of Experimental and Theoretical Physics* **1973**, *64*, 82-89.

50. Cornish, T. J.; Cotter, R. J., High-order kinetic energy focusing in an end cap reflectron time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (22), 4615-4618.

51. Cornish, T. J.; Cotter, R. J., A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7 (11), 1037-1040.
52. Guilhaus, M., Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30 (11), 1519-1532.
53. Brown, R. S.; Lennon, J. J., Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **1995**, 67 (13), 1998-2003.
54. Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A., Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9 (11), 1044-1050.
55. Fuerstenau, S. D.; Benner, W. H., Molecular weight determination of megadalton DNA electrospray ions using charge detection time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9 (15), 1528-1538.
56. Fuerstenau, S. D.; Benner, W. H.; Thomas, J. J.; Brugidou, C.; Bothner, B.; Siuzdak, G., Mass spectrometry of an intact virus. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40 (3), 541-544.
57. Brunelle, A.; Chaurand, P.; Della-Negra, S.; Le Beyec, Y.; Baptista, G., Surface secondary electron and secondary ion emission induced by large molecular ion impacts. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1993**, 126, 65-73.
58. Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A., A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 376 (7), 952-965.
59. Amstalden van Hove, E. R.; Smith, D. F.; Heeren, R. M. A., A concise review of mass spectrometry imaging. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (25), 3946-3954.
60. Bodzon-Kulakowska, A.; Suder, P., Imaging mass spectrometry: instrumentation, applications, and combination with other visualization techniques. *Mass Spectrometry Reviews* **2016**, 35 (1), 147-169.
61. Colliver, T. L.; Brummel, C. L.; Pacholski, M. L.; Swaneek, F. D.; Ewing, A. G.; Winograd, N., Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS. *Analytical Chemistry* **1997**, 69 (13), 2225-2231.
62. Gillen, G.; Bennett, J.; Tarlov, M. J.; Burgess Jr, D. R., Molecular imaging secondary ion mass spectrometry for the characterization of patterned self-assembled monolayers on silver and gold. *Analytical Chemistry* **1994**, 66 (13), 2170-2174.
63. Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G., Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* **2004**, 306 (5695), 471-473.
64. Wiseman, J. M.; Ifa, D. R.; Song, Q.; Cooks, R. G., Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45 (43), 7188-7192.
65. Wiseman, J. M.; Ifa, D. R.; Venter, A.; Cooks, R. G., Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Nature Protocols* **2008**, 3 (3), 517-524.
66. Hillenkamp, F.; Unsöld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R., A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer. *Applied Physics* **1975**, 8 (4), 341-348.

67. Spengler, B.; Hubert, M., Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (6), 735-748.
68. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
69. Shroff, R.; Muck, A.; Svatoš, A., Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21* (20), 3295-3300.
70. Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Angel, P. M.; Caprioli, R. M., From whole-body sections down to cellular level, multiscale imaging of phospholipids by MALDI mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10* (2), O110. 004259.
71. Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M., Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* **2009**, *50* (Supplement), S317-S322.
72. Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C., Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (9), 1646-1652.
73. Bouschen, W.; Schulz, O.; Eikel, D.; Spengler, B., Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24* (3), 355-364.
74. Chaurand, P.; Schriver, K. E.; Caprioli, R. M., Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42* (4), 476-489.
75. Kaletaş, B. K.; van der Wiel, I. M.; Stauber, J.; Lennard, J. D.; Güzel, C.; Kros, J. M.; Luider, T. M.; Heeren, R. M. A., Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* **2009**, *9* (10), 2622-2633.
76. Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M., Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (7), 699-708.
77. Chaurand, P., Imaging mass spectrometry: current performance and upcoming challenges. *LC GC* **2011**, *9* (3), 30-37.
78. Franzén, B.; Yang, Y.; Sunnemark, D.; Wickman, M.; Ottervald, J.; Oppermann, M.; Sandberg, K., Dihydropyrimidinase related protein-2 as a biomarker for temperature and time dependent post mortem changes in the mouse brain proteome. *Proteomics* **2003**, *3* (10), 1920-1929.
79. Sköld, K.; Svensson, M.; Norrman, M.; Sjögren, B.; Svenningsson, P.; Andrén, P. E., The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: Stathmin 2-20 and peptides as sample quality indicators. *Proteomics* **2007**, *7* (24), 4445-4456.
80. Crecelius, A.; Götz, A.; Arzberger, T.; Fröhlich, T.; Arnold, G. J.; Ferrer, I.; Kretzschmar, H. A., Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* **2008**, *8* (6), 1276-1291.
81. Chaurand, P.; Norris, J. L.; Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Caprioli, R. M., New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **2006**, *5* (11), 2889-2900.

82. Leinweber, B. D.; Tsaprailis, G.; Monks, T. J.; Lau, S. S., Improved MALDI-TOF Imaging Yields Increased Protein Signals at High Molecular Mass. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20* (1), 89-95.
83. Strohalm, M.; Strohalm, J.; Kaftan, F.; Krásný, L. s.; Volný, M.; Novák, P.; Ulbrich, K.; Havlíček, V. r., Poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]-based tissue-embedding medium compatible with MALDI mass spectrometry imaging experiments. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (13), 5458-5462.
84. Sugura, Y.; Shimma, S.; Setou, M., Thin sectioning improves the peak intensity and signal-to-noise ratio in direct tissue mass spectrometry. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **2006**, *54* (2), 45-48.
85. Goodwin, R. J.; Pennington, S. R.; Pitt, A. R., Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics* **2008**, *8* (18), 3785-3800.
86. Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M., Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (4), 1145-1155.
87. Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M., Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19* (8), 1069-1077.
88. Thomas, A.; Patterson, N. H.; Laveaux Charbonneau, J.; Chaurand, P., Orthogonal organic and aqueous-based washes of tissue sections to enhance protein sensitivity by MALDI imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *48* (1), 42-48.
89. Deutskens, F.; Yang, J.; Caprioli, R. M., High spatial resolution imaging mass spectrometry and classical histology on a single tissue section. *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46* (6), 568-571.
90. Shariatgorji, M.; Källback, P.; Gustavsson, L.; Schintu, N.; Svenningsson, P.; Goodwin, R. J.; Andren, P. E., Controlled-pH tissue cleanup protocol for signal enhancement of small molecule drugs analyzed by MALDI-MS imaging. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (10), 4603-4607.
91. *ImagePrep user manual* Bruker Daltonik GmbH: Bremen, 2010; Vol. Revision 3.
92. TM-SPRAYER™ Tissue maldi sample preparation system. <http://www.htximaging.com/tm-sprayer/> (accessed 2016-06-23).
93. Thomas, A.; Patterson, N. H.; Dufresne, M.; Chaurand, P., (MA)LDI MS imaging at high specificity and sensitivity. In *Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry*, Cramer, R., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 129-147.
94. iMLayer. <https://www.shimadzu.eu/imlayer> (accessed 2016-06-23).
95. Boggio, K. J.; Obasuyi, E.; Sugino, K.; Nelson, S. B.; Agar, N. Y.; Agar, J. N., Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Expert Review of Proteomics* **2011**, *8* (5), 591-604.
96. Yang, J.; Caprioli, R. M., Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high spatial resolution. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (14), 5728-5734.
97. Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoeckli, M., MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mechanisms of Ageing and Development* **2005**, *126* (1), 177-185.
98. Castellino, S.; Groseclose, M. R.; Wagner, D., MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis* **2011**, *3* (21), 2427-2441.

99. Schwamborn, K.; Caprioli, R. M., Molecular imaging by mass spectrometry—looking beyond classical histology. *Nature Reviews Cancer* **2010**, *10* (9), 639-646.
100. Burrell, M.; Earnshaw, C.; Clench, M., Imaging matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *Journal of Experimental Botany* **2007**, *58* (4), 757-763.
101. Mullen, A. K.; Clench, M. R.; Crosland, S.; Sharples, K. R., Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (18), 2507-2516.
102. Grassl, J.; Taylor, N. L.; Millar, A., Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods* **2011**, *7* (1), 1.
103. Meriaux, C.; Arafah, K.; Tasiemski, A.; Wisztorski, M.; Bruand, J.; Boidin-Wichlacz, C.; Desmons, A.; Debois, D.; Laprévote, O.; Brunelle, A.; Gaasterland, T.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M., Multiple changes in peptide and lipid expression associated with regeneration in the nervous system of the medicinal leech. *PLoS ONE* **2011**, *6* (4), e18359.
104. Schey, K. L.; Hachey, A. J.; Rose, K. L.; Grey, A. C., MALDI imaging mass spectrometry of Pacific White Shrimp *L. vannamei* and identification of abdominal muscle proteins. *Proteomics* **2016**.
105. van Amerongen, Y. F.; Roy, U.; Spaink, H. P.; de Groot, H. J.; Huster, D.; Schiller, J.; Alia, A., Zebrafish brain lipid characterization and quantification by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Zebrafish* **2014**, *11* (3), 240-247.
106. Bhandari, D. R.; Schott, M.; Römpf, A.; Vilcinskas, A.; Spengler, B., Metabolite localization by atmospheric pressure high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging in whole-body sections and individual organs of the rove beetle *Paederus riparius*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (8), 2189-2201.
107. Lin, H.-T.; Slate, D. J.; Paetsch, C. R.; Dorfmann, A. L.; Trimmer, B. A., Scaling of caterpillar body properties and its biomechanical implications for the use of a hydrostatic skeleton. *The Journal of Experimental Biology* **2011**, *214* (7), 1194-1204.
108. Metcalf, C. L.; Flint, W. P., *Destructive and useful insects. Their habits and control*. New York, 1962.
109. Moulton, J. K.; Pepper, D. A.; Dennehy, T. J., Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Management Science* **2000**, *56* (10), 842-848.
110. Groseclose, M. R.; Castellino, S., A mimetic tissue model for the quantification of drug distributions by MALDI imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (21), 10099-10106.
111. Lipidomics Gateway.
112. Seeley, E. H.; Caprioli, R. M., MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends in Biotechnology* **2011**, *29* (3), 136-143.
113. Sosnowski, P.; Zera, T.; Wilenska, B.; Szczepanska-Sadowska, E.; Misicka, A., Imaging and identification of endogenous peptides from rat pituitary embedded in egg yolk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, *29* (4), 327-335.
114. Brignole-Baudouin, F.; Desbenoit, N.; Hamm, G.; Liang, H.; Both, J.-P.; Brunelle, A.; Fournier, I.; Guérineau, V.; Legouffe, R.; Stauber, J., A new safety concern for glaucoma treatment

demonstrated by mass spectrometry imaging of benzalkonium chloride distribution in the eye, an experimental study in rabbits. *PLoS One* **2012**, 7 (11), e50180.

115. Seeley, E. H.; Caprioli, R. M., Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (47), 18126-18131.

116. Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M., Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38 (7), 699-708.

117. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W., A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **2005**, 46 (5), 839-862.

118. Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M., Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* **2009**, 50 (Suppl), S317-S322.

ANNEXE 1 :

Paramètres utilisés pour la détermination du nombre de protéines dans FlexAnalysis :

A tree view on the left side of the 'Mass List Find' window. It contains a 'Mass List' folder, and under it, 'Find', 'Edit', and 'Processing' (which is expanded to show sub-items).	Mass List Find	
	Peak Detection Algorithm:	Centroid ▼
	Signal to Noise Threshold:	3
	Relative Intensity Threshold:	0 %
	Minimum Intensity Threshold:	50
	Maximal Number of Peaks:	500
	Peak Width:	10 m/z
	Height:	80 %
	Baseline Subtraction:	TopHat ▼

A tree view on the left side of the 'Smoothing' window. It contains a 'Mass List' folder, and under it, 'Find', 'Edit', 'Processing' (expanded), 'Smoothing' (highlighted in blue), and 'Baseline Subtraction'.	Smoothing	
	Select Algorithm:	SavitzkyGolay ▼
	Width:	20 m/z
	Cycles:	1 <small>Maximum allowed value depends on width</small>

ANNEXE 2 :

Figure supplémentaire S-1. Spectres MALDI MS/MS typiques des phospholipides observés dans une section tissulaire de chenille : A) PA(35:1) B) PE(36:4) C) PC(34:1) D) PI(44:0). Un schéma de fragmentation est présenté pour chaque espèce. Les MS/MS des PC ont été acquis en ionisation positive, tandis que ceux pour les PA, PE et PI ont été acquis en ionisation négative.

